INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE IASI

PROF. DR. DOC. L. ABABEI   CONF. DR. M. TRANDAFIRESCU

BIOCHIMIE
(PARTEA II)
RESPIRAȚIA CELULARĂ SI CICLUL KREBS

1974

Dnoisne

INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE IASI

Prof.Dr.Doc.L.Ababei Conf.Dr.M.Trandafirescu

BIOCHIMIE
(partea II)

Respirația celulară
și
Ciclul Krebs

- 1974 -

Comme c'est curieux, comme c'est bisarre, et quelle coïncidence!

E.Ionesco

Procesului de respiraţie celulară care generează cantitatea principală de energie în celula vie cu regim de viaţă aerob, autorii îi dedică paginile ce urmează, încercînd să contribuie la uşurarea efortului de înţelegere al acestui proces mult studiat dar complicat şi încă insuficient cunoscut.

Materialul se adresează în primul rînd studenţilor medicinişti şi farmacişti.

Autorii vor fi recunoscători acelora care vor aduce completări şi vor face observaţii cu privire la cuprinsul lucrării.

Aducem mulţumiri şi pe această cale tov. Ing. chimist Croitoru Irina pentru ajutorul acordat la redactare.

L.Ababei

Maria Trandafirescu

INTRODUCERE

Toate organismele aerobe au proprietatea de respiraţie celulară, cu alte cuvinte, de a oxida moleculele substanţelor nutritive cu ajutorul oxigenului molecular. Semnificaţia biologică a respiraţiei celulare o depăşeşte cu mult pe aceea a respiraţiei pulmonare. Aceasta din urmă ca şi funcţia de transportor de oxigen a hemoglobinei sînt numai procese auxiliare ale respiraţiei celulare.

Respiraţia celulară pune la dispoziţia celulei energie sub formă de adenozintrifosfat (ATP) care se formează din adenozindifosfat (ADP) şi fosfat anorganic (P_a). Această reacţie este conectată funcţional la procesul de respiraţie celulară şi poartă denumirea de fosforilare oxidativă (P/O)controlînd consumul de oxigen cu componentele fosforilării oxidative (ATP,ADP şi P_a). In majoritatea celulelor, cea mai mare parte a sintezei de ATP se face în procesul de fosforilare oxidativă, ATP-ul fiind sursa de energie universală pentru o varietate mare de procese celulare ca:reacţii sintetice, contracţie musculară,activitate electrică, procese de transport, etc.Ca rezultat al acestor procese

consumatoare de energie, ATP este hidrolizat în ADP și P_a care apoi poate fi din nou convertit în ATP prin fosforilarea oxidativă, închizînd astfel ciclul metabolismului general energetic.

Materia vie este într-o stare permanentă progresivă de schimbări chimice și fizice. Caracteristic pentru materia vie este procesul de creștere și de îmbătrînire, proces care nu începe la o etapă anumită a istoriei procesului de viață, ci o expresie a faptului că încă din momentul apariției primelor forme de viață, survin și schimbări fizice și chimice în structura materiei vii. Aceste schimbări implică un continuu flux de energie. Contribuția pe care o au procesele de respirație celulară în această direcție, este de două naturi :

- furnizează compuși intermediari, din care poate fi constituită materia vie,
- canalizează fluxul energetic pe căile metabolice implicate în sinteza materiei vii.

Prin termenul de fosforilare oxidativă, se înțelege un proces de fosforilare cuplat cu un proces de oxidare. In celula vie întîlnim procesul de fosforilare a ADP de către P_a. Formal am putea reda reacția de fosforilare oxidativă după ecuația :



$$AH_2 + B + ADP + P_a \rightleftharpoons A + BH_2 + ATP + H_2O$$

care reprezintă suma a două reacții esențial ireversibile și anume :



$$AH_2 + B \longrightarrow A + BH_2$$



$$ADP + P_a \longrightarrow ATP + H_2O$$

Pentru ca fosforilarea ADP să aibă loc, oxidarea substratului AH_2 (dehidrogenarea acestuia) trebuie să elibereze suficientă energie pentru a permite formarea de ATP.

Calea glicolitică a metabolismului energetic este activă în absența oxigenului şi a fost denumită de L.Pasteur, cu mulţi ani în urmă "La vie sans l'air." Glicoliza poate fi reconstruită în soluţie, cu enzime purificate.

Procesele de viaţă aerobe, folosesc un mijloc de conservare a energiei - fosforilarea oxidativă - care nu poate fi reconstruită în soluţii, datorită faptului că necesită o organizare structurală a enzimelor. Această structură este materializată în mitocondrii denumite şi centrale energetice ale celulei.

Celula vie este o maşină chimică, izotermă, care transformă energia pe care o absoarbe din mediul înconjurător, în energie chimică pe care o foloseşte în reacţiile chimice implicate în procesele de biosinteză a componentelor celulare, în activitatea osmotică necesară pentru transportul diferitelor materiale în celulă sau pentru activitatea mecanică a contracţiei şi locomoţiei.[1] In prezent, inginerii tehnologi, se străduiesc să construiască astfel de maşini care să poată converti

energia chimică izotermică în energie mecanică, adică acel tip de conversie de energie care obişnuit se întîlneşte în activitatea celulară. Aceasta este şi una din sarcinile principale ale bionicii, ştiinţă care îşi are începuturile în urmă cu 20 de ani, şi care îşi propune un program grandios de a copia în tehnică sisteme şi funcţii ale materiei vii, ale celulei, ale organismelor.

Dacă în urmă cu cîţiva ani, mitocondria prin activitatea respiratorie era considerată centrala energetică a celulei, studiile recente ale structurii şi funcţiei acestei substructuri celulare, au complicat mult aceste consideraţii. Capacitatea mitocondriilor de a se autoreplica, prezenţa în acestea a unor forme specifice de ADN, pun probleme noi şi importante pentru genetică şi diferenţierea celulară, dependente de asemenea de activitatea mitocondrială.

Dacă în urmă cu cîţiva ani, se putea vorbi despre o compartimentare celulară în care intra şi un compartiment mitocondrial,[2] astăzi se vorbeşte despre o compartimentare a reacţiilor enzimatice în interiorul mitocondriei, despre rolul structurilor membranare în mecanismul de fosforilare, despre rolul mitocondriei în transportul de ioni, etc.

Date în legătură cu structura mitocondrială.

Esențial în structura mitocondriilor sînt dubla membrană și cristele caracteristice.

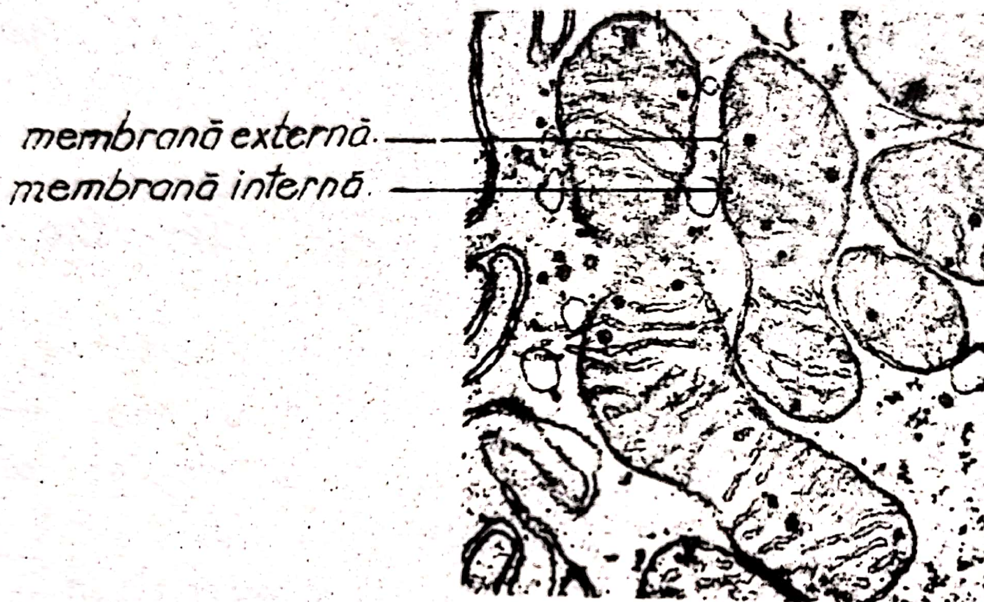
Incă din 1953, Palade[3] a arătat că numărul cristelor mitocondriale și conformația acestora, variază considerabil de la un tip de mitocondrie la altul. Deci elemente comune pentru toate mitocondriile sînt: o membrană externă, o membrană internă, cristele și matricea mitocondrială sau lichidul mitocondrial, granulele dense și ADN mitocondrial.

Prin matrice (lichid mitocondrial) se înțelege spațiul dintre criste și membrana internă, care mai poartă denumirea și de "compartiment intern mitocondrial".

Spațiul dintre membrana internă și membrana externă, poartă denumirea de "compartiment extern mitocondrial".

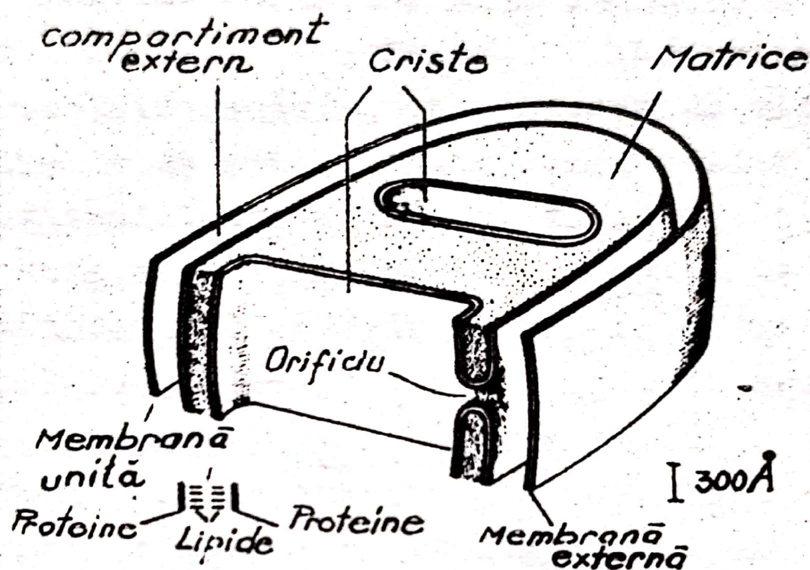
Cristele au structuri bimembranare și spațiul dintre aceste două membrane este în legătură cu compartimentul extern mitocondrial.

In figura care urmează sînt redate mitocondrii dintr-o celulă acinară de pancreas. (după Palade mărire x 70000)



In timpul umflării (swelling) mitocondriei, acest spaţiu ca şi compartimentul exterior mitocondrial sînt mult mărite.

Whittaker[4] ilustrează o secţiune transversală prin mitocondrie din care se văd relaţiile dintre diferite compartimente mitocondriale.



Mitocondrii pot fi găsite în citoplasma tuturor celulelor aerobe, eucariotice. Numărul mitocondriilor deși relativ constant pentru anumite tipuri de celule, poate varia în funcție de vîrstă sau activitate funcțională.

Celula hepatică de șobolan conține în jur de 1000 mitocondrii iar spermatozoidul circa 20-30 mitocondrii. Pentru mitocondriile de ficat, cele mai studiate, cercetările electron microscopice au arătat o lungime de circa 2 μ și o lățime de circa 1 μ. In bacterii dimensiunile mitocondriilor sînt aproximativ aceleași.

Forma mitocondriilor variază după tipul de

celulă.Este sferică la celulele de drojdie,rotundă la celulele hepatice,cilindrică la celulele rinichiului, filiformă la fibroblaşti.S-au descris mitocondrii şi în formă de lespede şi stelate.

In funcţie de starea metabolică a celulei,mitocondriile îşi pot schimba cu uşurinţă forma şi uneori pot agrega capăt la capăt formînd structuri filamentoase.In general ele sînt localizate în apropierea structurilor ce consumă ATP,produs al activităţii mitocondriale sau în apropierea unei surse de substrat de care depinde respiraţia mitocondrială.

In celula musculară cu activitate intensă ca aceea a muşchiului aripei de la insecte,mitocondriile sînt aranjate în lungul miofibrilei egal distanţate. In aceste fibre musculare de culoare roşie-datorită conţinutului mare în mioglobină şi citocromi-respiraţia serveşte ca sursă principală de energie pentru refosforilarea ADP-ului în procesul de fosforilare oxidativă mitocondrială.

Dacă muşchiul este stimulat la o activitate maximală, atît consumul de glucoză cît şi cel de oxigen creşte. Creşterea consumului de oxigen este rezultatul scindării ATP-ului în ADP în timpul contracţiei musculare,livrînd în acest mod ADP în calitate de acceptor de fosfat şi astfel stimulînd atît transportul de electroni pentru care ADP-ul este factor limitant,cît şi activitatea izocitric dehidrogenazei,pentru care ADP-ul este modulator pozitiv ca efector alosteric.

ATP-ul format în mitocondriile celulei musculare, trebuie să parcurgă o distanţă extrem de scurtă pentru a ajunge la elementele contractile din miofibrilele consumatoare de ATP.

Problema genezei şi înmulţirii mitocondriilor este foarte actuală. Astfel André[5] în 1962 consideră că : "Le problème difficile de l'origine des mitochondries a donné lieu à des débats passionnés, il est encore aprement discuté. Pendant longtemps, les partisans de la scissions mitochondriale se sont opposés aux partisants de la formation de novo.La scission a été maintes fois observée,... mais on n'a pas demontré qu'elle corresponde à une augmentation du volume total du chondriome, c'est-à-dire à une vraie multiplication".

Brosemer[6] studiind dezvoltarea musculaturii aripii la Locusta migratoria, ajunge la concluzia că, creşterea condriomului în acest caz se face prin creşterea mitocondriilor de bază, în sensul unei automultiplicări a materialului mitocondrial.

In mitocondrii, a fost pusă în evidenţă prezenţa ADN[7,8,9,10] şi ARN[8,9,10,11]. De asemeni s-a izolat din mitocondrii şi o ARN polimerază[10,11,12,13,14]. Aceste date arată că în aceste organele celulare semiautonome, există o reală capacitate de sinteză a ARN, asemănătoare celeia din nucleu.Fry[56] descrie o ADN-polimerază în mitocondriile de celule HeLa, dependentă de ADN. Aceasta diferă de ADN-polimeraza din aceleaşi celule, din nuclei şi citoplasmă prin cinetică, greutate mo-

leculară și sensibilitate la inhibitori. ADN mitocondrial din celulele mamiferelor, este circular și apare în diferite forme moleculare[57,58,59,60]

Capacitatea mitocondrială de sinteză a ADN a fost demonstrată _in vivo_[61,62,63] și _in vitro_ [64,65,66]. O ADN polimerază a fost izolată și caracterizată din mitocondriile de ficat[67,68,69].

Wu[70] descriind o ARN-polimerază dependentă de ADN din mitocondrii de ovare de Xenopus laevis arată că enzima necesită pentru activitate prezența ionilor de Mg^{2+}, este insensibilă la Mn^{2+}, folosește ca substrate nucleozid trifosfați, este un monomer cu o greutate moleculară de 46000 și este puternic inhibată de KCl, NaCl, și $(NH_4)_2SO_4$ în concentrații între 0,4 - 0,1 M. Polimerazele similare nucleare nu sînt inhibate de aceste săruri. Polimerazele nucleare sînt inhibate de alfa-amanitină, cele mitocondriale sînt insensibile.

ARN-polimeraza din mitocondriile de ficat de șobolan este sensibilă la rifampicină[71].

In 1973 Kuroiwa[15] demonstrează prin studii electron microscopice, digestie enzimatică și autoradiografie electron microscopică prezența atît a ADN cît și ARN în porțiunea centrală a mitocondriei și descrie distribuția în aceste organele a ARN nou sintetizat.

Ojala și Attardi[16] arată că structurile polizomale din mitocondrii de celule HeLa conțin 2 pînă la 7 monomeri 60S. Existența în mitocondrii a ribozomilor 55-60S, care reprezintă locul de încorporare al amino-

acizilor in vitro şi in vivo,cu caracteristicile necesare sintezei mitocondriale de proteine a fost descrisă şi pentru celulele hepatice de şobolan[17,18]. De asemeni se arată că polizomii mitocondriali sînt rezistenţi la tratamentul cu ARN-ază şi cu EDTA. Aceste fapte demonstrează că polizomii mitocondriali se deosebesc de polizomii legaţi de reticulum endoplasmatic care sînt sensibili atît la tratamentul cu ARN-ază cît şi cu EDTA.

Există date suficiente din experimente autoradiografice care arată că replicarea ADN-ului mitocondrial este independentă de replicarea ADN-ului nuclear [20,21,22,23,24], ca şi prezenţa în mitocondrii a unui aparat enzimatic pentru replicarea ADN mitocondrial.[25,26] Mattoccia[27] studiind replicarea ADN-ului mitocondrial în raport cu ciclul celular din celule HeLa, arată că replicarea ADN-ului mitocondrial are loc asincronic, deci autonomă faţă de celulă.

Linnane[28,29], Thomas[30] şi Coen[31] au demonstrat că genele rezistenţei la antibiotice sînt localizate în ADN-ul mitocondrial. Gingold[32,33] şi Rank[34] caracterizează gena rezistenţei la eritromicină din ADN-ul mitocondrial.

Datele prezentate mai sus arată că mitocondriile au o capacitate reală pentru sinteză de proteine. In această direcţie sînt utile de remarcat o serie de lucrări[35,36,37,38,39] în care este descrisă capacitatea de sinteză de proteine în mitocondriile celulelor din cortexul cerebral, puternic diferenţiate.

După cum se ştie, celulele neuronale ale creierului comunică între ele prin procese sinaptice. Terminaţiile sinaptice la capătul lor periferic sfîrşesc într-o umflătură sinaptică umplută cu vezicule sinaptice şi mitocondrii[40]. Această zonă a celulei nervoase necesită cantităţi importante de proteină pentru a-şi îndeplini funcţiile specializate. In timpul omogenizării cortexului cerebral, umflăturile sinaptice se rup, se separă de celulele din care provin şi se adună într-un fel de organele foarte fragile din punct de vedere osmotic, denumite sinaptozomi de Whittaker.[41]

In ultimii ani, s-a studiat capacitatea de sinteză petru proteine, a diferitelor fracţiuni sinaptozomiale.

Gordon[38] arată că celulele neuronale conţin mitocondrii specializate, capabile de sinteză de proteine pe o cale care este mai sensibilă la cicloheximidă decît la cloramfenicol. Este bine cunoscut faptul[19] că mitocondriile din alte ţesuturi, sintetizează proteine printr-un mecanism care este inhibat de cloramfenicol şi este complet rezistent la cicloheximidă.
Sinteza de proteine din mitocondriile cortexului cerebral este puternic inhibată de cicloheximidă[38,39]. Aceste observaţii arată că mitocondriile din umflăturile sinaptice sînt mitocondrii specializate cu rol în sinteza acelor proteine folosite exclusiv în joncţiunea sinaptică. In acelaş sens sînt şi rezultatele care arată

că încorporarea amino-acizilor în proteine de către fracţiunea mitocondrial-sinaptozomială este inhibată de oubaină, care în acelaş timp nu modifică activitatea respiratorie a mitocondriilor purificate[42].

Recent, din mitocondriile cortexului cerebral au fost izolaţi ribozomi 80 S[37]. Din mitocondriile de ficat de şobolan, s-a izolat o formă monomerică de ribozomi 55S. Particulele ribozomale sedimentate la acest coeficient (55S), incorporează ^{14}C-leucină. Radioactivitatea specifică pentru aceşti ribozomi este de circa 1000 impulsuri/min/mg proteină, în timp ce mitocondriile din care aceştia sînt izolaţi au numai o activitate specifică de 21 impulsuri/min/mg proteină. Aceasta demonstrează rolul activ jucat de aceste particule în incorporarea mitocondrială a aminoacizilor[45, 46]. Este deci demonstrat faptul că în mitocondrii există condiţii autonome pentru sinteza de proteine, găsind aici ADN, tARN(ARN de transfer), mARN(ARN mesager) şi rARN(ARN ribozomal)[45].

Sinteza de proteine mitocondriale, din punct de vedere al mecanismului funcţional, este asemănătoare aceleia din sistemul microzomal citoplasmatic, chiar dacă aceasta are loc în absenţa fazei solubile citoplasmatice adăugate sau a pH 5 enzimelor[45,47,48,49,50].

Este bine stabilit acum faptul că mitocondriile conţin ARN, ADN şi că sînt organele cu capacitate de replicare. Se consideră că ADN din mitocondrii, conţine cel puţin o parte din informaţia ereditară necesară

în procesul de replicare mitocondrială şi în creştere. Distribuţia mitocondriilor în celulă este determinată de funcţia acestora şi este o ilustrare ideală a interrelaţiilor dintre structura şi funcţia celulei.

Mitocondriile livrează ATP elementelor contractile din celula musculară în vecinătatea cărora se găsesc în număr mare, mitocondriile sînt aglomerate la suprafaţa celulelor epiteliale livrînd ATP pentru transportul activ. Deasemeni reticulul endoplasmatic este distribuit în straturi circulare cu un bogat conţinut în ribozomi, în jurul mitocondriilor din celule cu o sinteză activă de proteine şi **deasemeni** în unele celule mitocondriile sînt dispuse în imediata apropiere a picăturilor de grăsime(51).

Adesea mitocondriile sînt prezentate ca un exemplu special a unei categorii mai mari de organele definite ca plastide. Astfel celulele vegetale conţin pe lîngă mitocondrii şi leucoplaste care sînt plastide implicate în transformarea glucozei în amidon, conţin deasemenea chromoplaste care sînt locul de sinteză şi de localizare a celor mai mulţi pigmenţi ai plantelor şi în sfîrşit conţin cele mai importante plastide care sînt chloroplastele organele în care are loc procesul de fotosinteză.

Cloroplastele în celulele plantelor eucariotice sînt înconjurate cu un înveliş dublu membranar cu membrane deosebite formînd în interior o structură puternic laminată. La plantele superioare cea mai mare

parte a structurii laminate este concentrată într-un fel de saci întinşi, denumiţi "discuri"sau "thylakoizi" şi care frecvent se string într-un fel de aglomerări denumite "grana", cu mai multe"grana" pentru fiecare plastid.

La plantele inferioare ca algele verzi, discurile sînt la fel de mari ca şi plastidul şi sînt unite într-o singură "grana".

In celulele fotosintetice procariotice ca bacteriile fotosintetice nu necesită cloroplaste ca organele separate şi sistemul membranar fie că este laminat, fie că este vezicular este distribuit în interiorul celulei, fiind concentrat în apropierea membranei celulare.

Sistemul fotosintetic de transport de electroni, la celulele vegetale, este conţinut într-o structură membranară - cloroplastul - după cum sistemul de transport de electroni din celula animală, este conţinut în membranele mitocondriale.

Procesul de fotosinteză necesită două componente separate:

- un sistem membranar, asociat cu procesul de fotosinteză,

- un sistem granular, descoperit recent în cloroplaste.Acesta este constituit din granule în formă de sfere turtite cu un diametru de circa 100 Å. Aceste granule poartă denumirea de "quantosomi" şi conţin clorofilă şi enzimele necesare etapei iniţiale a procesului

de fotosinteză. Cloroplastele ca şi mitocondriile, sînt organele cu capacitate de autoreplicare şi conţin ADN.(51) Atît mitocondriile cît şi cloroplastele, sînt organele celulare, semiautonome care ca şi virusurile, sînt capabile de reproducere şi diviziune. Această capacitate pare să fie posibilă numai în condiţiile în care aceste organele se găsesc în interiorul celulei şi nu izolate din aceasta.

Datele obţinute pînă în prezent, arată că atît cloroplastele cît şi mitocondriile, au echipamentul enzimatic necesar pentru sinteza de proteine. Mitocondriile pot sintetiza multe proteine dar nu toţi constituenţii proteinici proprii. De exemplu, mitocondriile nu pot sintetiza citocromul c, sinteza căruia se face în ribozomii citoplasmei extramitocondriale. Siekevitz(51) presupune că ADN nuclear şi nu ADN mitocondrial, conţine genomii pentru sinteza citocromilor. El consideră că mitocondriile, prin aparatul zibozomal şi acizi nucleici proprii, sînt capabile să sintetizeze numai "proteinele structurale" ale membranelor cristei.

Pare posibil că în timpul diviziunii celulare, mitocondriile celulei fiice sînt produse prin diviziunea mitocondriilor celulelor mamă şi nu se formează _de novo_, din precursori nemitocondriali ai matricei citoplasmatice.

O serie de date, arată că atît mitocondriile cît şi cloroplastele, au o existenţă semiautonomă şi în sensul continuităţii acestor organele dintr-o generaţie în alta, care depinde de structura lor proprie iar la

rîndul ei, de colaborarea dintre acestea și restul celulei.[51,52,53,54,55]

Din datele prezentate pînă acum, rezultă că mitocondriile cu ADN, ARN și ribozomii proprii, sînt capabile să sintetizeze proteine, care în anumite limite se aseamănă cu sinteza de proteine din citoplasmă. Sinteza de proteine din mitocondriile dr ficat de șobolan,[72] nu este inhibată de către ARN-ază și de cicloheximidă care prin urmare nu inhibă încorporarea L-[U-^{14}C]-Leucinei în proteinele mitocondriale. Penicilina și streptomicina la concentrații suficient de mari pentru a inhiba creșterea bacteriană,inhibă foarte puțin (circa 10%)încorporarea L-[U-^{14}C]-leucinei în aceleași proteine. In schimb, cloramfenicolul și teramicina, inhibă total încorporarea amino acidului în proteinele din ficat.

Aceste date arată că sinteza mitocondrială de proteine, diferă de aceea citoplasmatică. Cardell[73] analizînd la microscopul electronic efectele hipofizectomiei asupra morfologiei celulei hepatice, ajunge la concluzia că hipofizectomia produce o ușoară creștere în volumul mitocondrial. Mitocondriile izolate din ficatul de șobolan hipofizectomizat, sînt sensibile la inhibiția decuplanților fosforilării oxidative. Hipofizectomia reduce semnificativ, capacitatea mitocondriilor de încorporare a amino acizilor in vitro. S-a demonstrat de asemeni că hipofizectomia reduce capacitatea de fosforilare oxidativă a mitocondriilor

de ficat de pisică. Injectarea de hormon somatotrop la şobolan, duce de asemeni la scăderea capacităţii de fosforilare oxidativă a mitocondriilor cu L-β-hidroxibutirat ca substrat.[74] De aici se poate trage concluzia că o capacitate de fosforilare oxidativă redusă, nu poate fi cauza scăderii capacităţii mitocondriilor de ficat de şobolan hipofizectomizat, pentru încorporarea amino acizilor.[75]

Nishimura, arată că în mitocondriile de ficat normal, comparativ cu mitocondriile de ficat de şobolan hipofizectomizat, conţinutul în [^{14}C]-leuciltARN este mai mare. S-a arătat de asemeni, că hipofizectomia scade capacitatea mitocondriilor de încorporare a uridinei.[72] Tratamentul şobolanilor hipofizectomizaţi cu hormon somatotrop uman, duce la o creştere semnificativă a capacităţii de sinteză de proteine mitocondrială în ficat, măsurată prin capacitatea de încorporare a [U-^{14}C]-leucinei <u>in vitro</u> şi <u>in vivo</u>.[72]

Din studiile lui Maddaiah,[72] rezultă că hormonul somatotrop, stimulează sinteza de proteine în mitocondriile de ficat. Proteinele astfel sintetizate, deşi puţine la număr, reprezintă o parte importantă a structurii membranare, esenţială pentru localizarea şi funcţionarea diferitelor componente ale lanţului de transport de electroni.[76,77]

Deosebit de interesante sînt datele, care arată că celulele de Saccharomyces cerevisiae, care cresc anaerob, conţin promitocondrii nerespiratorii.[78,79,80,81]

După aerarea celulelor de drojdie anaerobe, promitocondriile sînt convertite în mitocondrii respiratorii. Această modificare diferenţială necesită o colaborare strînsă între sinteza de proteine citoplasmatică şi sinteza de proteine promitocondrială. Astfel, adaptarea respiratorie este blocată atît cu cicloheximidă (inhibitor al sintezei de proteine citoplasmatice) cît şi cu cloramfenicol(inhibitor al sintezei de proteine mitocondrială).Contribuţia individuală a acestor două sisteme de translaţie, poate fi separată parţial în timp. La început, sistemul de translaţie mitocondrial, sintetizează o serie de intermediari ai adaptării la respiraţie, care sînt inductibili de către oxigen. Aceşti intermediari se pot acumula dar nu pot singuri, să condiţioneze începutul procesului respirator, pînă cînd nu se sintetizează complimentar, produşi ai sintezei de proteine citoplasmatice de asemenea oxigen-inductibile.

S-au adus dovezi experimentale care precizează faptul că oxigenul, controlează translaţia pentru o clasă de proteine specifice la nivelul ribozomilor promitocondriali[83]. Oxigenul induce sinteza unor proteine în promitocondrii cu o greutate moleculară între 30.000 şi 42.000. Această sinteză este complet inhibată de cloramfenicol (4mg/ml), de eritromicină (2mg/ml), şi de acriflavină (12,5 μg/ml)[83]. Sinteza de proteine promitocondriale indusă de oxigen, este inhibată şi de o concentraţie de 3,6% glucoză.Acriflavina inhibă

specific transcripţia ADN mitocondrial din drojdie[84].
Această inhibiţie a dus la următoarele concluzii:

-Sinteza de proteine controlată de oxigen este codificată de ADN mitocondrial.

-mARN mitocondrial are un timp de înjumătăţire 3 1/2 - 4 1/2 minute,deci foarte scurt.

-Foarte puţin mARN poate fi introdus în mitocondriile din citoplasmă.

In timpul adaptării la aerobioză a celulelor de drojdie anaerobe apar modificări în structura hemoproteinelor. Studiind spectrofotometric[267] adaptarea respiratorie la Saccharomyces cerevisiae s-au observat tranziţii spectrale dela citocromul b_1(cu bandă alfa de 557,5 şi 551 nm),la citocromii b (559 nm),citocromul c (548 nm), şi apariţia citocromului c_1(cu bandă alfa de 554 nm).

In studii recente s-a demonstrat că în timpul adaptării la aerobioză a celulelor de drojdie,atît creşterea capacităţii respiratorie[268] cît şi sinteza de citocromi[170] sînt inhibate de o mixtură de cloramfenicol şi cicloheximidă.

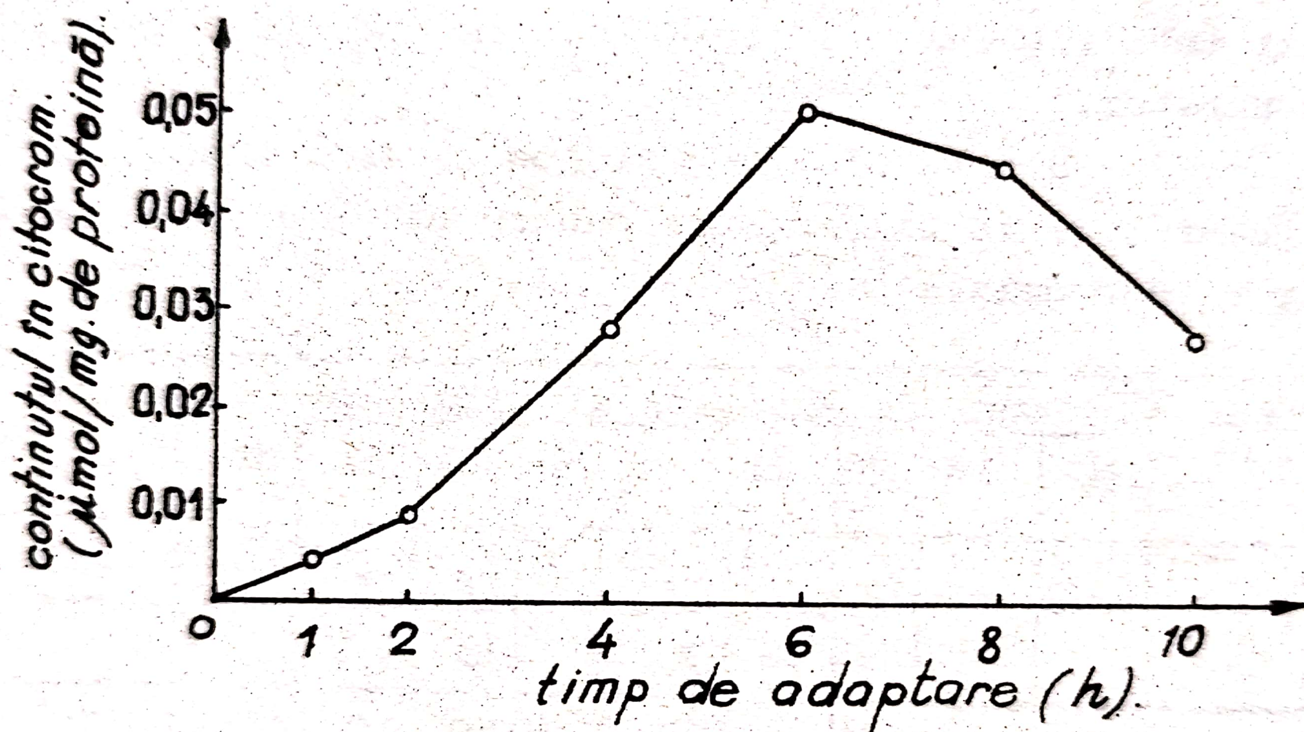
Cartledge[270] arată că după sfărîmarea mecanică a sferoplastelor de S. carlsbergensis,după 5 ore de daptare respiratorie, se obţine o suspensie mitocondrială ce conţine toţi citocromii de tip a şi c.
Membrana mitocondrială devine mai fragilă.
Raportul citocromilor de tip a faţă de citocromii b şi c este variabil în diferite etape ale procesului de

adaptare.Asamblarea lanţului transportor de electroni se desvoltă pe măsură ce componentele individuale ale acestuia se sintetizează.Numai la conţinuturi ridicate de citocromi,ca cele găsite în celulele ce respiră apar interacţiuni citocrom-citocrom specifice lanţului respirator.

Din tabelul de mai jos se vede timpul de înjumătăţire în milisecunde pentru oxidare în suspensii mitocondriale[270].

Citocromi	Timpul de adaptare al celulelor									Celule ce cresc aerob
	30'	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	
a_3	~50	~50	~20	0,5	0,3	0,5	0,7	0,35	0,25	0,3
a				20	4	6	15	3,7	3	5
c	~100	<100	30	20	25	6,5	50	10	<15	<100
c_1		<100		45	25		70		30	
b_{560}		200		150		100	90			
b_{566}		Nu se oxidează.		500		>200	Reducere			

Din figura de mai jos se vede conţinutul în citocrom $a + a_3$ în diferite stadii ale adaptării respiratorii.



Conținutul în citocrom $a+a_3$ din fracțiunea mitocondrială din S. carlbergensis la diferite stadii de adaptare.
Conținutul în citocrom a fost calculat din modificările de E observate la 445-458 nm.

Deci celulele de S.cerevisiae provenind din culturi anaerobe nu posedă mitocondrii și nici lanț respirator[271,272] dar conțin promitocondrii[273].
In prezența oxigenului molecular ca indicator specific în cîteva ore se produce sinteza sistemului respirator, și în special al citocromilor după cum am mai arătat și apar mitocondriile funcționale[271].

Glucoza în concentrații mari reprimă acest proces[274] iar galactoza favorizează acest proces în calitate de sursă de energie în mediu[275].

Van Wijk[276] a arătat că concentrația de 3',5'-AMP este de 6 ori mai mare la celulele cultivate în prezență de galactoză decît la celulele cultivate în prezență de glucoză.Prin urmare represia sintezei sistemului respirator poate fi dependentă de cantitatea de AMP_c intracelular.De aceea este logic să presupunem că AMP_c imprimă celulelor de drojdie o viteză de adaptare respiratorie, și aceasta în mod deosebit atunci cînd în mediu de cultură se găsește glucoza.Experimental s-a demonstrat că sinteza de protohem și deci a citocromului c este un fenomen discontinu, iar Barrett [277] demonstrează că formarea nucleilor hematinici (hemul b,c și a) se efectuiază de novo și că în celula anaerobă nu există niciun fel de rezervă de hem de la care aceste grupări prostetice ar putea să se sintetizeze.

Groot[83] arată că citocrom oxidaza din celulele de drojdie aerobe conține 6 lanțuri polipepti-

dice diferite dintre care pentru trei s-a demonstrat translaţia la nivelul ribozomilor mitocondriali.Două dintre aceste polipeptide au aceeiaşi greutate moleculară (34000 şi 42000) ca şi produşii proteinici ai translaţiei controlate de oxigen în mitocondrii,descrişi mai sus.S-ar putea ca aceşti produşi să fie asociaţi cu citocrom oxidaza ca subunităţi ai acestei enzime,a cărei sinteze se ştie că este dependentă de oxigen şi inhibată de glucoză,cloramfenicol şi eritromicină.[85]

Rubin şi Tzagoloff[86] studiind originea biosintetică a citocrom oxidazei în legătură cu sinteza de proteine din mitocondrii şi citoplasmă,găsesc că trei din subunităţile mari polipeptidice ale citocrom oxidazei sînt transcrise la nivelul ribozomilor mitocondriali.

Citocrom oxidaza din drojdie ar conţine şapte subunităţi polipeptidice[86,87] cu greutăţi moleculare între 35000 şi 8600.Aceşti autori aduc argumente experimentale prin tehnici de imunoprecipitare pentru a arăta că şapte subunităţi proteinice ale citocrom oxidazei din drojdie sînt sintetizate în mitocondrie.Studiindu-se sinteza citocrom oxidazei la Neurospora crassa s-a demonstrat că în mitocondrii se sintetizează trei subunităţi proteinice cu greutăţi moleculare de 36000,28000 şi 20000.[88,89]

Studiind biosinteza glutamat dehidrogenazei din ficatul de şobolan,Godinot şi Lardy,[133] demonstrează că aceasta are loc în microzomi.Glutamat dehidrogenaza din ficatul de şobolan este localizată în matricea mitocondrială [134,135,136].Parţial această enzimă este legată de

membrana internă[136].Incorporarea de ^{14}C-izoleucină în subunităţile glutamat dehidrogenazei din ficat a arătat că aceasta are loc iniţial în enzima legată de microzomi şi apoi în glutamat dehidrogenaza din mitocondrii[133].Glutamat dehidrogenaza microzomală,extrasă în tampon fosfat,s-a prezentat într-o formă la fel de activă ca şi enzima din mitocondrii.

Glutamat dehidrogenaza radioactivă purificată,adăugată la omogenate de ficat a fost legată atît de membrana mitocondrială cît şi de membranele microzomale în timpul fracţionării omogenatului.Se presupune că glutamat dehidrogenaza poate fi temporar legată de microzomi prin legături lipido-proteice şi apoi poate fi translocată în mitocondrii.

Beattie[137] arată că mitocondriile au o capacitate de sinteză de proteine limitată,şi că multe proteine mitocondriale sînt sintetizate în alte regiuni ale celulei.Aceasta este valabil nu numai pentru celulele mamiferelor,dar şi pentru celulele organismelor inferioare,ca Neurospora crassa[138].
S-a demonstrat că cea mai mare parte a proteinelor mitocondriale solubile, se sintetizează în afara mitocondriilor şi că numai un număr restrîns de proteine mai puţin solubile, este sintetizat în mitocondrii[133].

Distrugerea şi reînnoirea mitocondriilor se face prin mecanisme care sînt încă neclare.Astfel în 1961,Fletcher[245] arată că viteza de reînoire a citocromului c,a fosfolipidelor totale,a proteinelor solu-

bile şi insolubile din mitocondrii este aproximativ egală şi anume,toate aceste componente au timp de înjumătăţire de circa 9-11 zile.

Aceste fapte ne fac să presupunem că mitocondriile sînt sintetizate şi degradate ca un tot unitar.

Beattie[246] observă în schimb că o parte din fracţiunile proteice au o viteză de reînoire identică,în timp ce alte proteine solubile au o viteză de reînoire mult mai mare.

Bartley[247] arată că proteinele mitocondriale şi fosfolipidele totale au o viteză de reînoire similară.Datorită faptului că în structura mitocondrială găsim două componente stucturale majore şi anume membrana internă şi externă,este foarte posibil ca sinteza şi degradarea acestor membrane,să aibă loc pe căi diferite.Enzime ca δ-aminolevulinic acid sintetaza[248] şi ornitinamino transferaza şi alaninamino transferaza [249],au o viteză de reînoire mult mai mare decît aceea a altor componente mitocondriale.

S-a observat că ADN mitocondrial reprezintă una dintre puţinele componente structurale ale mitocondriilor care poate fi obţinută în stare pură.ADN este localizat în matricea mitocondrială[250],iar în celulele de drojdie este asociat cu structura mezozomală[251].

In tabelul de mai jos este indicat timpul de înjumătăţire a constituenţilor mitocondriali din diferite ţesuturi la şobolan.

Organ sau constituent	Timpul de înjumătățire în zile	Indicații bibliografice
Ficat		
Lipide	10,6	245
Proteine solubile	10,8	245
Proteine insolubile	10,1	245
Citocrom c	9,7	245
Proteine totale mitocondriale	8,4	246
Proteine hidrosolubile	8,6	246
Citocrom c	8,6	246
Proteine contractile	8,4	246
Proteine structurale	8,8	246
Alți citocromi	8,2	246
Proteine hidrosolubile	4,2-5,1	249
Proteine solubile în 0,9% KCl	4,5-5,0	249
Proteine solubile în 0,6M KCl	4,6-5,3	249
Fracțiune 13% $(NH_4)_2SO_4$	4,3-5,3	249
Fracțiune 35% $(NH_4)_2SO_4$	3,9-4,8	249
Rezidiu	4,7-8,8	249
Proteine insolubile	9,0	247
Fosfolipide	10	247
ADN mitocondrial	7-10	252

ADN mitocondrial	9,4±0,7	253
Cardiolipină	11,5±0,8	253
Lecitină	10,0±1,3	253
Fosfatidiletanol-amină	9,9±1	253
Sfingomielină	11,4±1,2	253
Rinichi		
Mitocondrii intacte	8,7	246
Proteine hidrosolubile	6,0	246
Proteine solubile în KCl	7,6	246
Proteine structurale	9,0	246
Alţi citocromi	8,4	246
ADN mitocondrial	10,4±1,2	253
Cardiolipină	11,4±4,5	253
Lecitină	10,0±2	253
Fosfatidiletanol-amină	17,4±3,1	253
Creier		
Fosfatidiletanol-amină	22,34,35	254
Lecitină	11,19,23	254
Fosfatidilserină	27	254
Fosfatidilinozitol	29,34	254
Mitocondrii întregi	26,3	246

Proteine hidrosolubile	17,9	246
Proteine insolubile în apă	31,4	246
ADN mitocondrial	48,7±16,0	253
Inimă		
ADN mitocondrial	6,7±1,0	253
Lecitină	10,5±1,0	253
Fosfatidiletanolamină	17,4±3,1	253

Viteza de reînoire a ADN nuclear este de 30 zile în ficat şi diferă de viteza de reînoire a ADN mitocondrial (9,4 zile).

Pînă în prezent numai pentru un număr restrîns de enzime din membrana mitocondrială internă, s-a demonstrat necesitatea produşilor de translaţie mitocondrială:

- Complexul ATP-azic sensibil la rutamycină, compus din cel puţin zece subunităţi proteinice[90,91,92,93], din care patru sînt transcrise la nivelul ribozomilor mitocondriali[94].
- Ubichinona - citocrom c reductaza[86] şi
- Citocrom oxidaza[86,87,89,95,96].



Structura și funcția membranelor mitocondriale.

Așa cum s-a arătat de către Palade[98] încă din 1952 în urma unor studii electronmicrografice, mitocondriile au o membrană sinuoasă iar în interiorul acestora se află un material nestructurat (matricea). Sjostrand[99] folosind secțiuni ultrafine, prin microscopie electronică, identifică la mitocondrii prezența unei membrane duble. Aceste observații au fost confirmate și de Palade care consideră că cristele mitocondriale reprezintă falduri ale membranei interne. El apreciază că structura mitocondrială este aceea a două camere legate între ele prin două membrane separate. Camera externă, denumită și spațiu intermembranar și care este delimitată de membranele externă și internă, în timp ce camera internă sau matricea este închisă complet de membrana internă, a cărei criste pătrund în interior.[100,101]

Fernandez-Moran[102] observă la colorarea negativă a membranei mitocondriale interne, prezența unor mici subunități în formă de ciupercă, dispuse la intervale egale în spațiul intramatriceal.
Aceste formațiuni sferice au un diametru de 85 Å și au fost identificate cu ATP-aza mitocondrială.[103]

După tratament cu ultrasunete, din mitocondrii de inimă de bou, se obțin particule submitocondriale care catalizează fosforilarea oxidativă, schim-

bul fosfor anorganic (P_a) - ATP şi hidroliza ATP.
Tratamentul acestor particule submitocondriale cu tripsină continuă să catalizeze fosforilarea oxidativă şi hidroliza ATP. Tratarea mai departe a acestor particule cu uree, scade puternic atît fosforilarea oxidativă cît şi activitatea ATP-azică. Pierderea activităţii ATP-zice corespunde morfologic dispariţiei formaţiilor în formă de ciupercă amintite mai sus.[103,104]

Cu ajutorul ATP-azei marcată cu tritium (^3H) s-a observat că tratamentul particulelor submitocondriale reconstruite cu uree 2M , duce la o pierdere a radioactivităţii care corespunde dispariţiei sferelor de pe membrana internă. Intrucît tratamentul cu uree 2 M este un procedeu drastic, s-au considerat necesare tratamente mai blînde pentru inactivarea ATP-azei, pentru a evalua relaţia dintre ATP-ază şi sferele de pe membrana internă.

Inactivarea ATP-azei prin răcire este semnificativ accelerată de unii anioni.[105] Deosebit de efectivi s-au arătat iodura de potasiu şi sulfocianura de potasiu.
Aceşti ioni rup sferele de pe membrana internă şi totodată se pierde şi activitatea ATP-azică.

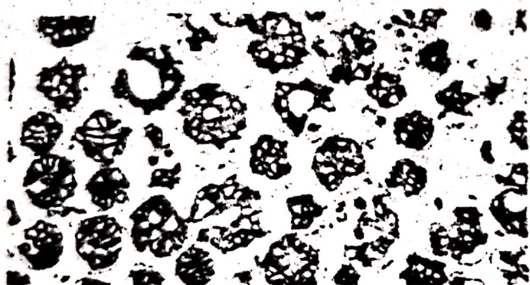
In membrana mitocondrială externă s-au găsit subunităţi mai mici ca dimensiuni (60 Å) şi într-o aranjare mai puţin ordonată.[106,107]

Ca răspuns la diferite condiţii, mitocondriile dintr-un număr mare de surse îşi schimbă forma şi volumul.
Hackenbrook[108] arată că în mitocondriile de ficat de

şobolan, ultrastructura membranei interne este influenţată de starea metabolică.Se disting două forme mitocondriale la examenul electronomicroscopic:

- o formă ortodoxă,"bogată în energie"
- o formă condensată,"săracă în energie"

In starea condensată, matricea este strînsă la un loc şi prin urmare mai puternic colorată. Dacă aceste mitocondrii sînt puse să respire în prezenţă de substrat şi P_a membrana internă se întinde şi ia forma ortodoxă. Mitocondria revine la forma condensată la adăugare de ADP(108,109,110)



(a) Forma condensată .



(b) Forma ortodoxă.

Mitocondrii de ficat de şobolan (x 27.000)

S-au descris în mitocondrii[111] modificări ultrastructurale reversibile care au fost atribuite modificărilor osmotice datorite "mişcării de ioni energizaţi".
Modificări osmotice similare au fost observate în timpul acumulării ionilor de calciu şi considerate că reprezintă un alt tip de modificări ultrastructurale.[113]

Green[114] constată modificări structurale ale membranei interne mitocondriale datorită conversiei energiei transportului de electroni, în energie conformaţională ce poate fi folosită direct pentru sinteza de ATP. Aceste modificări pot fi prevenite cu decuplanţi sau inhibitori.

Weinbach[115] arată că deşi fosforilarea oxidativă decuplată din mitocondriile de ficat de şobolan poate fi restaurată cu ajutorul albuminei serice, nu s-a reuşit şi o restaurare a structurii normale. S-a considerat că ATP sau intermediarii bogaţi în energie generaţi în timpul fosforilării recuplate, au un efect mai puţin evident asupra alterărilor morfologice mitocondriale.
Modificări structurale ale mitocondriilor de inimă de bou determinate osmotic, au fost descrise şi de alţi autori.[116,117]

Adăugarea de ADP este suficientă pentru a converti mitocondriile într-o stare condensată "neenergizată" care nu se mai modifică la adăugare de substrat şi P_a.

Cu toate că în aceste condițiuni se formează ATP,ultrastructura membranei interne determinată electronmicroscopic rămîne nemodificată[118].

Modificări conformaționale reversibile[119] pot fi induse în particulele submitocondriale, prin modificări de pH.

Intrucît în timpul respirației au loc mișcări de protoni[120], aceste modificări conformaționale par să fie secundare față de transportul de electroni și nelegate direct de conservarea energiei.Mitocondriile de ficat de șobolan care se fixează cu 0,8% glutaraldehidă,în raport cu modificările osmotice din membrană pot încă să oxideze substratele și să folosească energia obținută din această oxidare[121] pentru acumularea de Ca^{2+}.

Toate aceste date arată că variațiile morfologice importante observate în structura membranei interne mitocondriale sînt reale,dar nu pot fi necondiționat legate de activitatea metabolică.O parte din autori leagă aceste modificări ultrastructurale de activitatea osmotică,le consideră secundare transportului de ioni. Dar întrucît acesta este legat de starea metabolică a mitocondriei,nu este surprinzător faptul că în condiții controlate pot fi găsite relații însemnate între starea metabolică și conformația membranei mitocondriale interne.

In 1962 Lehninger[122] arată că pe lîngă modificările de volum " de mică amplitudine ",care sînt

reversibile, pot fi întîlnite şi modificări de mare amplitudine" cunoscute sub denumirea de umflare(swelling) şi contracţie mitocondrială. O parte din aceste modificări sînt reversibile, unele însă sînt ireversibile şi merg pînă la ruperea membranei externe.

Sottacasa[123] şi Parsons[124] pun la punct o tehnică pentru separarea membranelor interne şi externe în care umflarea şi contracţia mitocondrială este urmată de centrifugare în gradient de densitate.
Modificări în volum a mitocondriilor au fost folosite cu succes şi în analiza transportului de anioni descoperindu-se unele canale specifice pentru anioni prin membrana mitocondrială internă.[125]
Prin procedee mai drastice, membrana mitocondrială este ruptă cu formarea din membrana internă de particule submitocondriale.

Mitocondriile de ficat de şobolan distruse cu digitonină îşi păstrează activitatea fosforilantă.[126, 127] Particulele submitocondriale preparate cu această metodă păstrează membrana internă a sferelor orientate spre interiorul veziculelor[120], în timp ce particulele submitocondriale obţinute cu tratament cu ultrasunete au membrana internă a sferelor orientată spre mediu, spre exterior.[128,129] Tratarea mitocondriilor de ficat cu digitonină duce aşa cum s-a mai arătat, la izolarea de particule submitocondriale folosite cu succes în procesele de fosforilare oxidativă.[144]
In studii electron-micrografice Siekevitz[145] arată

că aceste particule au un diametru între 200-500 Å şi se prezintă în diferite stadii de agregare.

Levy[146] demonstrează că digitonina separă preferenţial membrana externă. Complexul mitocondrial intern rezultat poate fi mai departe separat cu digitonină.[147]

Separarea membranei externe poate fi evaluată enzimatic prin măsurarea pierderii activităţii unei enzime localizată exclusiv în această porţiune a mitocondriei. O astfel de enzimă este NAD-citocrom c reductaza(insensibilă la rotenon).[147,148,149,150]

Suspendarea mitocondriilor în soluţie 0,25M zaharoză cu digitonină în concentraţie finală de 1%, cu un raport de 1,1 mg digitonină/10 mg proteină duce la separarea completă a membranei externe mitocondriale la o centrifugare puternică de 105000 x g.

După separarea membranei externe, supernatantul poate fi din nou tratat cu digitonină ceea ce are ca rezultat ruperea membranei interne evidenţiată şi la examenul electron-microscopic.[147]

In urma acestui tratament membrana internă este fragmentată în particule mici rezultate din complexul membranar intern.

Aşa cum am mai arătat, membrana externă are ca enzimă "marker" NADH-citocrom c reductaza. Această enzimă se mai găseşte în celulă şi în fracţiunea microsomală, care conţine ca enzimă "marker" pentru aceasta, o NADPH-citocrom c reductază, localizată exclusiv în microzomi.

Lipsa activităţii acestei enzime din preparatul de membrană externă mitocondrială este un criteriu de puritate a acestui preparat,excluzînd contaminarea cu microzomi a acestuia.
După separarea membranei externe aşa cum am arătat, în supernatant rămîne complexul membranar intern mitocondrial,care conţine 50-60% din proteinele totale mitocondriale,membrana externă conţinînd numai 10% din proteinele totale.Restul de proteine par să fie asociate cu faza solubilă din mitocondrie .

Studiind modul de acţiune al digitoninei se presupune că aceasta acţionează prin solubilizarea lipoproteinelor din structura membranară.
S-a presupus deasemeni că digitonina se poate combina cu colesterolul pentru a forma digitonide şi că aceasta ar duce la solubilizarea sau distrugerea membranelor.
(151)

In 1957 Siekevitz[152] arată că digitonina acţionează asupra mitocondriilor din ficat într-un mod cu totul deosebit de acela al deoxicolatului.Dacă un strat de mitocondrii este acoperit cu deoxicolat şi se fac secţiuni în diferite puncte ale stratului se observă că mitocondriile sînt umflate şi distruse în raport direct proporţional cu cantitatea de deoxicolat care a străpuns stratul.Digitonina însă nu produce etape intermediare între mitocondria intactă şi particulele submitocondriale rupte în urma tratamentului.

Conţinutul relativ scăzut în succinic oxidază, citocrom oxidază şi citocromii de tip a din membrana externă(148,149) este un indiciu că lanţul respirator şi prin urmare şi fosforilarea oxidativă este asociat cu porţiunea internă a mitocondriei şi nu cu membrana internă.

Newman(153) studiind conţinutul în fosfolipide şi compoziţia în acizi graşi a acestora din mitocondrii de ficat, constată o concentraţie de fosfolipide de 0,163 µg atomi de fosfor fosfolipidic/mg de proteină. Acest raport scade la 0,118 după separarea membranei externe şi creşte la 0,292 după distrugerea membranei interne cu digitonină.

Analizînd distribuţia P-fosfolipidic în diferitele fosfolipide din mitocondrii s-a observat următoarea distribuţie:

Repartiţia fosfolipidelor în mitocondrii de ficat de şobolan (% P-fosfolipidic)(153)

Fosfatidil-colina	41,0 ± 0,5
Fosfatidil-etanol amina	35,6 ± 5,6
Cardiolipina	12,7 ± 3,5
Fosfatidil-inozitol	4,6 ± 3,8
Lizolecitină + sfingomielină	2,7 ± 2,4

După cum este cunoscut, lanţul transportor de electroni din mitocondriile de inimă de bovine, a fost

separat în patru complexe funcţionale enzimatice.[241] Toate aceste complexe sînt bogate în fosfolipide. Indepărtarea componentei lipidice, duce la pierderea activităţilor enzimatice; adăugarea de fosfolipide reface această activitate. Incercările de a scinda aceste complexe în subunităţi proteinice, duc la pierderea totală a activităţii enzimatice organizate. Aceste observaţii conduc la concluzia, că lanţul transportor de electroni există <u>in vivo</u>, în unităţi funcţionale şi morfologice, care nu sînt nici mai mici şi nici nu au o compoziţie mai simplă decît aceea a complexelor active.

Fernandez-Moran[242] identifică în cristele mitocondriale, o unitate macromoleculară care se repetă. Ulterior, s-a găsit un mozaic de unităţi discrete, de dimensiuni mai mici de 90 Å diametru şi care constitue ultrastructura complexelor transportoare de electroni.[243] Dacă complexul IV din lanţul respirator (citocrom oxidaza) este solubilizat cu acizi biliari, se constată o tendinţă de agregare a unor subunităţi particulate, cu diametrul de 50-100 Å. Dacă acizii biliari sînt îndepărtaţi (prin dializă şi spălare), subunităţile particulate se organizează în structuri veziculare membranare. Indepărtarea fosfolipidelor din citocrom oxidază, elimină capacitatea subunităţilor de a se organiza în vezicule.[241] De aci concluzia că citocrom oxidaza deficientă în fosfolipide nu se poate organiza în membrane. Dacă acestor preparate, li se adaugă componente fosfolipidice, veziculele formate, nu diferă cu nimic de

acelea ale enzimei originare.Deci fosfolipidele reprezintă elementele structurale în formarea membranelor veziculare din citocrom oxidază. Si cercetările lui Fernandez-Moran au arătat că preparatele de particule transportoare de electroni, reduse, sînt formate în întregime din vezicule ale cristei mitocondriale.[243] Astfel de vezicule posedă capacitatea de transfer de electroni[244] și sînt capabile să cupleze la transferul de electroni, fosforilarea ADP-ului.

Citocrom oxidaza este o enzimă puternic legată de membrană și este fără îndoială o parte a cristei mitocondriale.

Interesante modificări morfologice ale membranei interne au fost produse în mitocondriile de inimă de bou, prin tratarea acestora cu fosfolipază C.Structurile obținute cu acest tratament reprezintă forme intermediare între mitocondrii și particule submitocondriale. Aceste forme se comportă în teste funcționale, ca particule submitocondriale.In secțiuni efectuate în serie s-a observat că aceste structuri, constau din particule submitocondriale ale membranei interne, adunate de-o parte și de alta a membranei mitocondriale.

Modificări morfologice similare[131] s-au obținut și la tratamentul cu fosfolipază A. Tratamente mai drastice asupra mitocondriilor, au dus la modificări morfologice importante care însă nu totdeauna au condiționat și alterări corespunzătoare ale funcțiilor acestor organele.[132]

Yu[139] arată că extracția ubichinonei din mitocondriile de inimă de bou, duce la inactivarea NADH oxidazei și a succinat oxidazei din particulele submitocondriale. Inactivarea este reversibilă la adăugare de ubichinonă. Efecte similare constată și alți autori.[140,141,142]

Extragerea fosfolipidelor din particulele mitocondriale, cu soluție apoasă de acetonă, sau prin digestie cu fosfolipaze, duce la inactivarea respirației, inactivare care este reversibilă la adăugare de fosfolipide.[143]

Inactivarea cu fosfolipaza C a transportului de electroni mitocondrial demonstrează rolul fosfolipidelor în acest proces.
Fosfolipaza A,C, și D, inhibă activitatea succinic oxidazică, iar adăugarea de fosfolipide extrase din soia, protejează activitatea enzimei.[154] Indepărtarea fosfolipidelor cu acetonă, duce la o inhibare a respirației, care este reversibilă la adăugare de fosfolipide.

O analiză mai temeinică a acestui efect, a arătat că mitocondriile integre sînt insensibile la inhibiția cu fosfolipaze, în timp ce particulele submitocondriale arată o sensibilitate foarte mare. Oxidarea NADH -ului este mult mai sensibilă decît oxidarea succinatului. Dacă particulele submitocondriale sînt tratate cu fosfolipază C, întreaga activitate NADH oxidazică se pierde.

Aceste date, arată o sensibilitate puternică

a segmentului NADH - ubichinona, la lipoliză.[156,157]

Avantajul folosirii fosfolipazei C constă că în timp ce produşii acţiunii fosfolipazei A asupra fosfolipidelor - acizi graşi şi lizolecitină - sînt deosebit de toxici pentru fosforilarea oxidativă, fosforilcolina şi digliceridele, produşi ai acţiunii fosfolipazei C nu influienţează acest proces.

Interesant este faptul că adăugarea de cantităţi mari de albumină serică, restaurează parţial fosforilarea oxidativă înhibată cu acizi graşi şi lizolecitină. Incercări de restaurare a lanţului respirator după tratamentul cu fosfolipaze, par să aibă şanse mai mari după digestia cu fosfolipaza C, decît după digestia cu fosfolipaza A. Fosfolipaza C în prezenţa ionilor de Mg^{2+} şi Mn^{2+} inhibă schimbul ^{32}P - ATP şi raportul P/O cu circa 30-60% Adăugarea factorilor de cuplare[157] restaurează fosforilarea legată de oxidare din particulele submitocondriale.

Tratarea particulelor submitocondriale cu cholat 0,5 % şi precipitarea în soluţie de sulfat de amoniu 40 % duce la obţinerea unui preparat care conţine integral citocromul b şi c_1 dar care pierde total activitatea succinat citocrom c reductazică.Adăugarea de coenzimă Q şi de fosfatidil etanolamină, sau cardiolipină, reface total activitatea succinat citocrom c reductazică.[139] Acţiunea coenzimei Q nu este posibilă în absenţa fosfolipidelor, după cum şi acţiunea reactivantă a fosfolipidelor nu este posibilă în absenţa coenzimei Q.

Refacerea activităţii este sensibilă la antimicyнă A.

Membrana mitocondrială externă conţine o,83mg fosfolipide/mg proteină.

Membrana mitocondrială internă are un conţinut mai mic în fosfolipide şi anume o,28mg fosfolipide per mg.proteină.[158]

Conţinutul în cardiolipine este de peste 7 ori mai mare în membrana internă decît în membrana externă; în timp ce fosfatidil inozitolul şi fosfatidil serina sînt mai concentrate în membrana externă.

Cantităţi aproape egale de fosfatidil colina şi fosfatidil etanolamina au fost găsite în cele două membrane mitocondriale.[158,159]

Membrana externă conţine colesterol circa 30mg/mg proteină, la fel ca microzomii. Ernster şi Kuylenstierna[160] indică următoarea repartizare a diferitelor enzime în compartimentele mitocondriale:

Localizarea unor enzime în mitocondriile de ficat de şobolan.[160]

Membrana externă.

1. NADH citocrom c reductaza insensibilă la rotenonă
2. Monoamino oxidaza
3. Kinurenin hidroxilaza
4. Acil gras-CoA sintetaza ATP-dependentă
5. Glicerolfosfat aciltransferaza

6. Lizofosfatidat aciltransferaza
7. Lizolecitin aciltransferaza
8. Colin fosfotransferaza
9. Fosfatidat fosfataza
10. Fosfolipaza A_{11}
11. Nucleozid difosfokinaza
12. Sistemul de alungire al acizilor grași
13. Xilitol dehidrogenaza (NAD-specifică)
14. Tiokinazele acizilor grași

Spațiul intermembranar

1. Adenilat kinaza
2. Nucleozid monofosfokinaza
3. Nucleozid difosfokinaza
4. Xilitol dehidrogenaza (NAD-specifică)

Membrana internă

1. Lanțul respirator
   - Citocromul b
   - Citocromul c_1
   - Citocromul c
   - Citocromul a
   - Citocromul a_3
   - Coenzima QH_2 - citocrom c reductaza
   - Succinat dehidrogenaza
   - Succinat citocrom c reductaza
   - Succinat oxidaza
   - NADH citocrom c reductaza sensibilă la rotenon

- NADH oxidaza
- Colin citocrom c reductaza
- Citocrom c oxidaza
- Particule fosforilante legate de lanţul respirator

2. β-Hidroxibutirat dehidrogenaza
3. Ferochelataza
4. Acid δ -aminolevulinic sintetaza
5. Carnitin palmitiltransferaza
6. Sistemul enzimatic al oxidării acizilor graşi
7. Sistemul enzimatic de alungire al acizilor graşi
8. Xilitol dehidrogenaza (NADP-dependentă)
9. ATP-aza sensibilă la rutamicynă
10. ATP - sintetaze
11. α - cetoacid dehidrogenaze

Matricea

1. Glutamat dehidrogenaza
2. Malat dehidrogenaza
3. Izocitrat dehidrogenaza
4. α - cetoglutarat dehidrogenaza
5. Citrat sintetaza
6. Aconitaza
7. Fumaraza
8. Piruvat carboxilaza
9. Fosfoenolpiruvat carboxikinaza
10. Aspartat aminotransferaza

11. Ornitin carbamiltransferaza
12. Acil gras CoA sintetaze
13. Sistemele enzimatice pentru oxidarea acizilor grași
14. Xilitol dehidrogenaza (NADP - specifică)

Pe baza caracteristicilor morfologice, s-au adus argumente pentru ipoteza existenței unei direcționalități funcționale în membrana mitocondrială internă.[255,256,257]

S-a constatat că succinatul este oxidat la nivelul suprafeței interne (matriciale) a membranei interne,[258,259,260] în timp ce citocromul c este accesibil pe suprafața externă a membranei interne.[261,262]
Pe baza acestor constatări și ale altor observații s-a ajuns la concluzia că componentele lanțului respirator sînt orientate transversal în interiorul membranei.[262]

Aceste rezultate arată că suprafața internă și externă a membranei interne sînt diferite din punct de vedere chimic.
Asimetria chimică a celor două suprafețe corespunde unei asimetrii a densității celor două suprafețe ale membranei studiate electronmicroscopic și deci unei asimetrii în asamblarea constituenților macromoleculari ai membranei interne și sprijină ipoteza organizării vectoriale a componenților lanțului respirator în interiorul membranei.

Klingenberg[161] studiind permiabilitatea membranelor mitocondriale remarcă faptul că membrana externă este uşor permiabilă pentru substanțe cu greutate moleculară mică (nucleotide). Chappell[125] arată că în membrana mitocondrială internă există sisteme specifice pentru transportul ATP-ului şi citratului.

Tzagoloff[162] studiind complexele de transfer de electroni din celulele mamiferelor şi de drojdie ajunge la concluzia că acestea au aceleaşi componente oxido-reducătoare demonstrate atît prin proprietățile spectrale cît şi prin compoziţia preparatelor enzimatice. Astfel se demonstrează că citocrom oxidaza şi ATP-aza rutamicyn senzitive atît din mitocondriile de drojdie cît şi din mitocondriile de celule de inimă de bovine necesită pentru activitate prezenţa fosfolipidelor.[162,163,164]

Studiind sinteza ATP-azei mitocondriale (asa numitul factor F_1) s-a constatat că aceasta este diminuată de glucoză.

Activitatea ATP-azei mitocondriale creşte în depresie. Depresia,după represia cu glucoză este inhibată de cicloheximidă şi este insensibilă la cloramfenicol. Aceste date sînt interpretate în sensul,că locul de sinteză a F_1 este la nivelul ribozomilor citoplasmatici,de unde enzima ulterior este transportată în mitocondrie.[162,165]

Cloramfenicolul şi cicloheximida inhibă transportul de electroni în timpul depresiei.[165,166,167]

ATP-aza mitocondrială (F_1) este o componentă importantă a membranei mitocondriale interne.Această enzimă reprezintă mai mult de 10% din masa membranei interne a mitocondriei de inimă de bou.[168] Factorul F_1 reprezintă un element structural al membranei mitocondriale şi de aceea sinteza acestuia în celulă constituie un aspect important al biogenezei mitocondriale.

Datele prezentate pînă aici arată că sinteza mitocondrială de proteine este implicată în formarea funcţională a mitocondriei.Astfel în celulele de drojdie s-a observat că biosinteza enzimelor mitocondriale ca cele ale complexului lanţului respirator şi al complexului ATP-azic necesită participarea cooperaţională atît a sistemului de sinteză de proteină citoplasmatic cît şi a celui mitocondrial.[169,170,171]
S-a demonstrat cu precizie că există o sinteză de proteină mitocondrială independentă de citoplasmă,şi că cicloheximida inhibitor al sintezei citoplasmatice de proteine nu afectează încorporarea amino-acizilor radioactivi în cel puţin patru fragmente proteinice de pe membrana internă mitocondrială.[171]

Transportul de electroni şi procesul de fosforilare oxidativă.

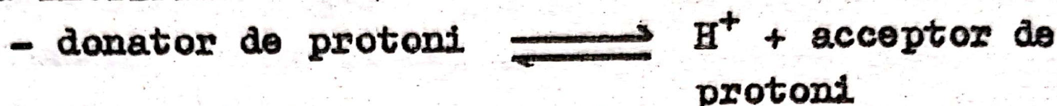
Perechile de electroni eliberate de pe intermediarii ciclului Krebs,sînt transformaţi printr-un lanţ în trepte de enzime transportoare de electroni cu un nivel de energie descrescîndă pînă cînd aceştea pot

reduce oxigenul molecular care este ultimul acceptor de electroni în procesul de respirație celulară.In acest timp cea mai mare parte din energia liberă a acestor electroni este conservată sub formă de legături pirofosforice macroergice în structura ATP într-un proces denumit "fosforilare oxidativă".Acest proces ca și transportul de electroni este găsit în toate celulele aerobe.Enzimele care catalizează aceste reacții sînt localizate în membrana internă mitocondrială,în celulele eucariotice și în membrana celulară în celulele procariotice.Aceste sisteme enzimatice ce catalizează transportul de electroni și fosforilarea oxidativă au o structură complexă și pot fi foarte greu izolate și studiate <u>in vitro</u>,întrucît sînt puternic legate de structura membranară.Membrana ca atare pare să fie un element esențial în procesele generatoare de energie.

<u>Reacții de oxido - reducere</u>.

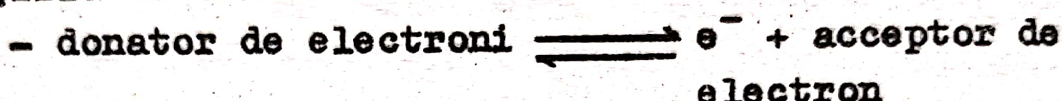
Reacțiile de oxido-reducere sînt acelea în care există un transfer de electroni de la un donator de electroni (reductant sau agent reducător) la un acceptor de electroni (oxidant sau agent de oxidare). Transferul de atomi de hidrogen este o posibilitate de transfer de electroni într-o serie de reacții de oxido-reducere.In unele reacții de oxido-reducere putem întîlni atît transfer de electroni cît și transfer de atomi de hidrogen.Electronii sau atomii de hidrogen participanți în reacțiile de oxido-reducere sînt adesea denumiți "echivalenți reducători" sau "electroni echivalenți".Agenții oxidanți și reducători de obicei

funcţionează ca perechi redox conjugate sau cupluri redox asemănător conjugaţilor acid-bază.Intr-o reacţie acid bază întîlnim:



- donator de protoni $\rightleftharpoons$ H^+ + acceptor de protoni

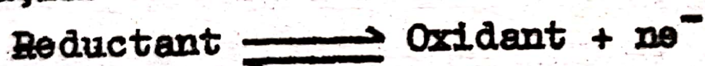
In reacţiile de oxido-reducere întîlnim:



- donator de electroni $\rightleftharpoons$ e^- + acceptor de electron

O constantă de echilibru poate desemna tendinţa unui agent reducător de a elibera electroni.

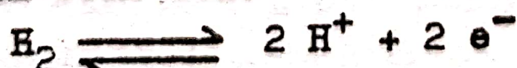
In sistemele biologice această tendinţă este denumită "potenţial reducător standard" definit drept forţa electromotrice (emf) în volţi dată de o jumătate de celulă în care specia reductantă şi oxidantă sînt ambele prezente în concentraţii de cîte 1,0 M la 25°C şi la pH 7,0 în echilibru cu un electrod care poate să accepte reversibil electroni de la specia reductantă după ecuaţia:



$$\text{Reductant} \rightleftharpoons \text{Oxidant} + ne^-$$

în care n reprezintă numărul de electroni transferaţi. (181)

Potenţialul de reducere standard este o valoare a presiunii de electroni a unui cuplu oxidant-reductant,generată în echilibru în condiţii specifice. Ca standard de referinţă se foloseşte potenţialul reducător al reacţiei:



$$H_2 \rightleftharpoons 2\,H^+ + 2\,e^-$$

care convenţional se aranjează la 0,0 volţi în condiţiile în care presiunea gazului de H_2 este de 1,0 atm.

[H^+] este 1,0 M, adică pH=0,0 și temperatura este de 25°C.

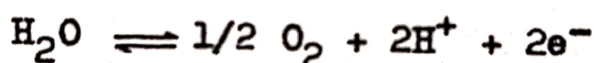
Cînd această valoare este corectată la pH 7,0 [H^+] =1 x 10^{-7}M, pH-ul de referință pentru toate calculele biochimice, potențialul standard de reducere al sistemului hidrogen-hidrogen ion, devine -0,42 volți.

In tabelul care urmează sînt prezentate potențialele standard de reducere ale unor cupluri redox biologice. Datele sînt calculate pe baza transferului a 2 electroni la pH=7,0 și T=25°-37°C.

Reductant	Oxidant	E_0' volți
Acetaldehida	Acetat	-0,60
H_2 (electrod de hidrogen)	$2H^+$	-0,42
Izocitrat	alfa-cetoglutarat + CO_2	-0,38
NADH + H^+	NAD^+	-0,32
NADPH + H^+	$NADP^+$	-0,32
Succinat	Fumarat	0,00
Lactat	Piruvat	-0,39
Malat	Oxalacetat	-0,16
NADH dehidrogenaza (redusă)	(oxidată)	-0,11
Citocrom a (Fe II)	(Fe III)	+0,29
Citocrom b (Fe II)	(Fe III)	0,00

Citocrom c Fe (II)	Fe (III)	+0,26
H_2O (electrod de hidrogen)	1/2 O_2	+0,82
Glutation redus	Glutation oxidat	+0,04

Sistemele care au un potenţial standard reducător mai negativ decît cuplul H_2-$2H^+$ au o tendinţă mai mare de a pierde electroni decît hidrogenul; sistemele cu un potenţial standard reducător mai pozitiv au o o tendinţă mai mică de a pierde electronii decît acest cuplu. Cuplul apă-oxigen, cu ecuaţia:



$$H_2O \rightleftharpoons 1/2\ O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

are un potenţial standard reducător de +0,815 volţi, deci puternic pozitiv, prin urmare are o tendinţă extrem de mică de a pierde electroni şi formează oxigen molecular.[171] Cu alte cuvinte, oxigenul molecular are o foarte mare afinitate pentru electroni, mult mai mare decît a unor acceptori de electroni ca NAD,flavoproteine sau citocromii.

Ecuaţia Nernst,exprimă raportul dintre potenţialul standard reducător a unui cuplu redox dat, a potenţialului său observat şi raportul concentraţiei donorului de electroni şi acceptorului de electroni după cum urmează:

$$E_h = E_o' + \frac{2,303RT}{nF} \log \frac{[\text{electron acceptor}]}{[\text{electron donor}]}$$

în care:

- E_o potențialul standard reducător (pH=7,0 T=25°C toate concentrațiile la 1,0 M)
- E_h potențialul observat a electrodului
- R constanta gazelor (8,31 Jouli grade^{-1} moli^{-1})
- T temperatura absolută
- n numărul electronilor transferați
- F Faraday (96406 Jouli volt^{-1})

La 25°C termenul 2,303 RT/nF are valoarea 0,05 cînd n=1 și 0,03 cînd n=2.

Intrucît se obișnuește să se calculeze echilibrele cuplurilor biologice redox în termenii transferului de 2 electroni, ecuația lui Nernst se simplifică la:

$$E_h = E_o' + 0,03 \log \frac{[\text{electron acceptor}]}{[\text{electron donor}]}$$

Potențialul standard reducător a diferitelor sisteme redox biologice facilitează postularea direcției fluxului de electroni de la un cuplu redox la altul, așa după cum potențialul de transfer de grupări fosfat permite postularea direcției în care grupările fosfat vor fi transferate enzimatic.

Sursa principală de energie în marea majoritate a celulelor aerobe, este procesul de oxidare biologică, proces în care transportul de electroni este cuplat cu fosforilarea ADP. Esența acestui proces poate fi mai ușor înțeleasă dacă vom compara concepția actuală asupra oxidării biologice cu vechile concepții

asupra procesului de respirație celulară.Conform vechilor concepții,respirația celulară era considerată ca suma unui număr infinit de mare de reacții de oxidare a diferitelor substrate;potrivit acestei concepții oxidarea fiecărui substrat își avea calea sa proprie. După noile concepții,oxidarea biologică se face printr-un număr restrîns de tipuri de reacții,oxidarea diferitelor substrate avînd căi comune.Astfel,oxidarea finală a hidraților de carbon,grăsimilor și proteinelor se face pe căi comune.Aceasta înseamnează că pentru toate substratele supuse oxidării biologice,oxidarea finală este identică.

Vechile concepții considerau că oxidarea biologică reprezintă o ardere de hidrați de carbon.După ce în 1780 Lavoisier observă că procesele oxidative din celula vie sînt identice cu arderea la flacără a substanțelor organice,s-a putut stabili că din punct de vedere energetic și termodinamic,oxidarea biologică și arderea la flacără pot fi similare.Căile celor două tipuri de oxidare sînt totuși fundamental diferite.
In timp ce arderea la flacără reprezintă oxidarea carbonului la CO_2,aceasta eliberînd cantități însemnate de energie,oxidarea biologică reprezintă oxidarea ionului de hidrogen de către oxigen,reacție care deasemeni livrează energie.Oxidarea hidrogenului se face într-o succesiune de reacții,prin care hidrogenul luat de la substrat este transportat în vederea eliberării lui pentru oxidare.
Concepția veche considera respirația celulară o reacție

într-o singură etapă cu eliberare de căldură.

Concepţia modernă consideră oxidarea biologică un proces în mai multe etape, în care energia se eliberează treptat. De aici se vede că în celula vie, carbonul şi hidrogenul sînt metabolizaţi pe căi diferite. Diferitele molecule de substanţe organice sînt metabolizate în final pe o cale comună pînă la CO_2 în ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs). Eliberarea de energie se face în reacţia de oxidare a hidrogenului similară reacţiei gazului detonant:



$$H_2 + 1/2\ O_2 \longrightarrow H_2O \qquad \Delta G = -\ 57 \text{Kcal/mol apă formată}$$

Oxidarea carbonului în CO_2 în celula vie are loc fără modificări energetice semnificative.

Oxidarea hidrogenului care are loc în mai multe etape este cuplată cu un transfer de energie prin substanţe macroergice (ATP).

Enzime oxido-reducătoare participante în transferul de electroni.

Sînt cunoscute trei clase principale de enzime oxido-reducătoare care participă în transportul de electroni de la substratele organice la oxigenul molecular. In ordinea participării lor în lanţul respirator, acestea sînt:

A. Dehidrogenaze piridin nucleotid -dependente

B. Dehidrogenaze flavin nucleotid-dependente

C. Citocromi

A. Dehidrogenaze piridin nucleotid-dependente.

Cu ocazia unui Congres dedicat dehidrogenazelor piridin nucleotid-dependențe, care a avut loc la Konstantza (Germania) în 1969, H.Theorell arăta în concluziile finale ale congresului:
"Presupun că mulți dintre noi în aceste zile ne-am gîndit la marele maestru german care ne-a deschis întregul cîmp al enzimelor piridinice și flavinice, Otto Warburg."

După ce în anul 1931 lui O.Warburg i s-a decernat premiul Nobel pentru descoperirea reacției chimice în care oxigenul molecular reacționează în lumea vie (reacția citocrom oxidazei) în anul 1944 pentru a doua oară i se acordă premiul Nobel, pentru descoperirea rolului nicotinamidei în transportul de hidrogen de către dehidrogenaze piridin nucleotid-dependente.

Așa cum arată în 1936 O.Warburg[172] drept coenzimă pentru dehidrogenaze pot servi cele două piridin nucleotide, NAD și NADP pe care inițial le-a numit difosfopiridin nucleotid (DPN) și respectiv trifosfopiridin nucleotid (TPN).Se poate considera astăzi că NAD este coenzima piridin nucleotidică implicată în special în procesele degradative în care hidrogenul substratului este introdus în lanțul respirator pentru oxidarea lui, în vederea acumulării de energie,[173,174] sub formă de ATP în timp ce NADP este forma coenzimatică implicată în special în căile metabolice reductive biosintetice.[175,176] Această separare nu este absolută,

întrucît prin intermediul unei piridin nucleotid transhidrogenaze care catalizează reacţia:

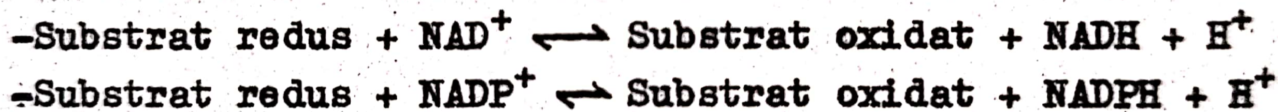


$$NADPH + H^+ + NAD^+ \longleftrightarrow NADP^+ + NADH + H^+$$

poate fi catalizat un proces de oxido-reducere între cele două piridin nucleotide.[177] Activitatea acestei transhidrogenaze explică formarea de ATP în timpul oxidării NADPH.[173,174,178]

Structura stereochimică, biosinteza, degradarea şi principalele funcţii metabolice ale NAD şi NADP sînt descrise în Cursul de biochimie (Fasc.I)[179] apărut în 1974.

Piridin nucleotid dehidrogenazele catalizează următoarele tipuri de reacţii:



-Substrat redus + $NAD^+ \longleftrightarrow$ Substrat oxidat + $NADH + H^+$

-Substrat redus + $NADP^+ \longleftrightarrow$ Substrat oxidat + $NADPH + H^+$

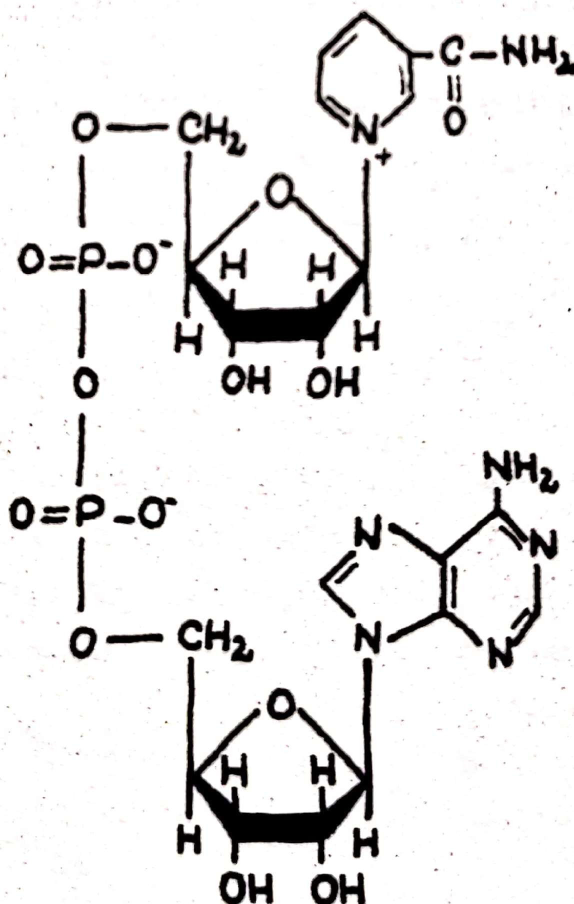
NAD şi NADP au fost găsite în toate tipurile de celule. Aşa cum s-a mai arătat, în celulă, concentraţia de NAD este mai mare decît cea de NADP. Peste 60% din NAD celular se găseşte localizat în mitocondrii restul găsindu-se în citoplasma celulară. Aproape tot NADP se găseşte în citoplasmă şi numai urme găsim în mitocondrii.

Dehidrogenazele NAD-dependente servesc în primul rînd în respiraţia celulară şi participă în transferul de electroni de la substrat la oxigen, în timp ce NADP dehidrogenazele sînt implicate în transferul de electroni de la substratele generate în catabolism la

reacțiile reductive ale diferitelor procese biosintetice. NAD și NADP se leagă reversibil cu proteinele dehidrogenazelor în timpul ciclului catalitic.De aceea aceste două coenzime pot fi privite mai curînd ca substrate decît ca grupări prostetice ale dehidrogenazelor.

Nicotinamida este partea activă din structura NAD și NADP pe care se grefează hidrogenul acceptat de la substratul dehidrogenat.

Structura NAD



Dehidrogenazele piridin nucleotid - dependente pot fi împărțite în două grupe:

-Dehidrogenaze simple pentru care substratul oxidabil este un alcool,o amină primară,sau un semiacetal,iar produs al dehidrogenării este aldehida,cetona sau lactona corespunzătoare.

-Dehidrogenaze complexe care catalizează atît un proces de oxidare cît și de fosforilare.O astfel de enzimă este glicerin aldehid 3-fosfat dehidrogenaza.

In timpul procesului catalizat de piridin nucleotid dehidrogenaze,se formează un complex ternar între enzimă,coenzimă și substrat.Date experimentale arată că într-o primă fază a procesului catalitic se formează un complex enzimă-coenzimă.[240] Acest complex a fost demonstrat folosind metode de analiză ca:separarea ultracentrifugală și dializă;analiză spectrofotometrică a complexului enzimă-coenzimă;analiza fluorimetrică a complexului coenzimă redusă-enzimă;analiza dispersiei optice rotatorie.[180,240]

De pe urma acestor studii efectuate pe un număr însemnat de dehidrogenaze piridin nucleotid dependente ca malat dehidrogenaza,[182] lactat dehidrogenaza din inimă de bovine,[183,184] lactat dehidrogenaza din mușchiul scheletic[185] alcool dehidrogenaza din ficat de cal[186,187,188] etc.,s-a observat că pentru marea majoritate a acestor dehidrogenaze,o moleculă de NAD sau de NADH se leagă pe un fragment polipeptidic cu o greutate moleculară de 35000-40000.S-a mai stabilit că

NAD sau NADH ocupă acelaş loc pe molecula de enzimă. O remarcă interesantă a fost făcută şi în privinţa conţinutului metalic a multor dehidrogenaze piridin nucleotid dependente. In această privinţă s-a constatat că alcool dehidrogenaza conţine Zn şi anume la o greutate moleculară de 87000 enzima din ficatul de om[189, 190] conţine doi atomi de Zn şi două molecule de NAD. Glutamat dehidrogenaza din diferite ţesuturi are deasemeni un conţinut însemnat de ioni de Zn .[191,192, 193,194,195]

Prezenţa ionului de Zn^{2+} a fost demonstrată şi în structura alcool dehidrogenazei şi din alte ţesuturi arătîndu-se şi modul de legare a ionului de Zn^{2+} cu molecula de proteină enzimă.[196,197,198]

Wallenfels[199,200] şi Mahler[201] arată că Zn din molecula de alcool dehidrogenază are un rol central în legarea substratului şi al coenzimei. Ei apreciază că restul de adenină din structura NAD sau NADH, prin gruparea NH_2 de la C_6 se leagă cu ionul de Zn^{2+} din molecula de enzimă. Orto fenantrolina în competiţie cu NAD sau NADH pentru ionul de Zn^{2+} inhibă activitatea alcool dehidrogenazei. Ioni de Zn^{2+} au fost identificaţi şi în glicerin-aldehid-3-fosfat dehidrogenaza din muşchi de porc, enzimă NAD -dependentă care pentru o moleculă cu o greutaţe moleculară de 137000 conţine 2 pînă la 3 atomi de Zn. Aceeaşi enzimă din muşchi de bovine şi din drojdie conţine deasemeni ioni de Zn.[202,203,204]
Malat dehidrogenaza din inimă de bovine care are greutatea moleculară de 40000 are în structură o moleculă

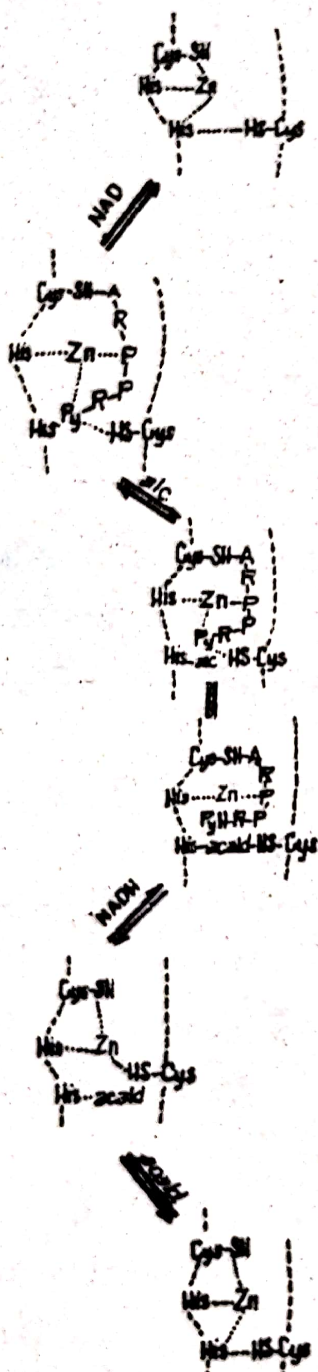
de NAD şi un atom de Zn.[205]
Se presupune că ionul de Zn din structura dehidrogenazelor amintite leagă NAD sau NADP de proteina enzimă.

Grupările sulfhidrilice (-SH) par să fie esenţiale în activitatea catalitică a acestor enzime.Astfel s-a putut demonstra că para-hidroximercuribenzoatul (PHMB) şi iod acetatul (IA),para-clormercuribenzoatul (PCMB) şi ionii metalelor grele inhibă activitatea alcool dehidrogenazei din drojdie.[206,207,208]
Există o proporţionalitate directă între scăderea numărului de -SH libere şi scăderea cantităţii de coenzimă legată de enzimă.[200,208,209] Coenzima protejează grupările sulfhidrilice de carboximetilare.[210]

Wallenfels[211] arată că ionii de Zn se leagă de molecula de alcool dehidrogenaza din drojdie,pe de o parte prin grupările sulfhidrilice,iar pe de altă parte printr-un rest de histidină.

Keleti[212] dă următoarea secvenţă reacţională pentru alcool dehidrogenaza din drojdie; schemă redată pe pagina următoare.

După cum se vede din schemă prima etapă din activitatea acestei enzime,este legarea de coenzimă.Nucleul de piridină al coenzimei se leagă de ionul de Zn, iar nucleul de adenină se leagă de enzimă printr-o grupare sulfhidrilică.[213,214,201] Substratul la această enzimă se leagă de restul de histidină din centrul activ al enzimei.[214]
Din această schemă se vede că grupările sulfhidrilice di



centrul activ al enzimei, participă în legarea Zn și în legarea coenzimei.

Prezența Zn și a grupărilor -SH a fost demonstrată pentru toate dehidrogenazele piridin nucleotid dependente. La fel a fost demonstrată în participarea enzimatică a unui rest de histidină esențial.

Si pentru lactat dehidrogenază-enzimă deasemeni NAD dependentă pentru care mult timp prezența Zn în molecula de enzimă a fost controversată, s-a putut stabili după atacarea moleculei de enzimă cu uree, prezența acestui ion metalic.(215)

Sînt cunoscute circa 200 dehidrogenaze piridin nucleotid dependente care pot deci livra hidrogeni lanțului respirator.

NADH - dehidrogenaza lanțului respirator.

NADH-dehidrogenaza lanțului respirator leagă oxidarea NADH generat metabolic în sistemul terminal de transport de electroni. Porțiunea activă a acestor enzime este reprezentată prin molecula de flavin nucleotid din complexul flavoproteinic enzimatic. Acest complex flavoproteinic poate fi izolat în diferite forme active cu proprietăți moleculare și catalitice diferite.

Se pare că NADH-dehidrogenaza catalizează transferul de electroni la un acceptor încă insuficient cunoscut, probabil o proteină Fe-neheminic care se găsește în lanțul respirator.

Preparatele de NADH-dehidrogenaze din lanțul respirator se obțin în diferite forme moleculare. Sînt descrise trei categorii de NADH-dehidrogenaze:

- NADH dehidrohenaze legate de structura mitocondrială, ca de ex. Complexul I a lui Hatefi[216] care este solubil și care conține o fracțiune enzimatică cu greutate moleculară mare și una cu greutate moleculară mică. Fracțiunea cu greutate moleculară mare conține aproape în totalitate activitate NADH dehidrogenazică din membrana mitocondrială. Are un conținut bogat în lipide, conține coenzima Q_{10} și o structură proteinică separată de cea proteinică propriu zisă.[216,217]

- NADH dehidrogenaze care pînă acum au fost obținute numai prin extracție cu fosfolipază A la temperatura de 30°C. Enzima solubilă astfel obținută, este sta-

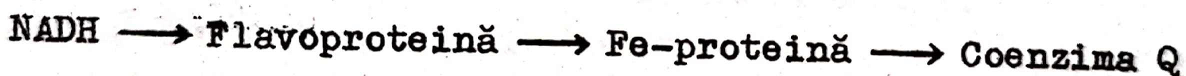
bilă. Din punct de vedere al proprietăţilor, acest tip de dehidrogenaze seamănă mult cu NADH dehidrogenazele descrise mai sus. Astfel în aceste două tipuri de dehidrogenaze se găseşte un raport Fe-neheminic/FMN de 16-18 şi un raport Sulf labil/FMN de circa 27. Porţiunea Fe - Sulf arată o valoare a semnalului g = 1,94 dacă este redusă de către substrat în cazul măsurării rezonanţei electronice paramagnetice de spin. Specificitatea de substrat este aceeaşi pentru ambele dehidrogenaze, reacţionează puternic cu fericianura, iar cinetica reducerii cu fericianură este similară cu aceea observată în preparatele membranare, arătînd de asemeni o foarte mică reactivitate cu oxigenul, cu citocromul c şi cu diverşi coloranţi (activitate diaforazică).[217,218,219,220]
Deosebirea dintre proprietăţile catalitice ale acestei ultime NADH dehidrogenaze şi Complexul I constă în prezenţa numai în complexul I a unei activităţi coenzimă Q reductazică sensibilă la rotenonă şi amital.
In complexul I găsim o serie de fosfolipide absente în enzima solubilă, obţinută sub acţiunea fosfolipazei A. Aceste fosfolipide sînt indispensabile în activitatea enzimei cu coenzima Q adăugată din afară, sistemului.

- NADH dehidrogenaze cu greutate moleculară mare, obţinute din porţiunea particulată (structurală) mitocondrială sub influienţa unor agenţi ca: enzime proteolitice, uree, tiouree, căldură, sau asociind căldură, pH acid şi etanol. Astfel de dehidrogenaze au fost izolate din mitocondriile de inimă.[221,222,223,224]

Toate preparatele obţinute prin căldură în mediu acid şi cu etanol, au o greutate moleculară de circa 80000, iar raportul Fe/FMN şi S/FMN este foarte mic, de circa 2 - 4. Semnalul de rezonanţă electronică paramagnetică indus de substrat lipseşte.

In ceea ce priveşte originea şi semnificaţia diferitelor forme moleculare de NADH dehidrogenaze, se poate considera că forma cu o greutate moleculară mare, este un complex multienzimatic, care sub influienţa diferiţilor agenţi enzimatici, chimici, sau fizici, poate disocia în componentele enzimatice individuale ale acestuia.[225]

Hatefi[220,226] consideră NADH dehidrogenaza drept un complex multienzimatic format dintr-o flavoproteină şi-Fe,-S-proteină. In acest complex multienzimatic secvenţa transportului de electroni, este postulată în modul următor:


NADH ⟶ Flavoproteină ⟶ Fe-proteină ⟶ Coenzima Q

Tratarea comlexului I cu uree duce la scindarea NADH dehidrogenazei în fragmente cu greutate moleculară mică şi cu activitate asemănătoare citocrom reductazei. Alături de aceste fragmente au fost de asemeni izolate, altele tot cu greutate moleculară mică - flavoproteine - conţinînd FMN,Fe, şi S labil în raport 1:4:4 cu proprietăţi foarte asemănătoare acelora descrise pentru NADH citocrom reductaze.

Au mai fost izolate şi fragmente polipeptidice

conţinînd cantităţi egale de Fe şi S însă fără conţinut flavinic. Flavoproteina a fost decolorată de către NADH după cum s-a şi presupus, iar Fe-proteina a fost numai foarte puţin decolorată de către NADH. In schimb, în prezenţa flavoproteinei s-a observat o decolorare rapidă a Fe-proteinei de către NADH.[226,228,227]

In 1955 Ernster[229] descoperă efectul inhibitor selectiv al amitalului asupra oxidărilor mitocondriale pentru substrate NAD-dependente. Ulterior, amitalul şi alte barbiturice ca rotenona şi piericidina A au fost larg folosite ca inhibitori ai oxidării NADH.

Studii efectuate cu inhibitori marcaţi cu ^{14}C au arătat că toate aceste trei clase de inhibitori, reacţionează la acelaş loc din structura NADH oxidazei şi că piericidina A este cel mai eficient şi specific, chiar la concentraţii foarte mici.

In 1956 B.Chance[230] arată că amitalul şi alte barbiturice întrerup transportul de electroni în mitocondrii la etapa dintre NADH şi flavoproteine. Studiile spectrofotometrice au confirmat justeţea acestui postulat în cazul rotenonei.[231,232]

Hatefi[220] măsurînd efectul rotenonei, piericidinei A şi barbituricilor asupra modificărilor absorbţiei la 460 nm şi la 510 nm observă că rotenona şi piericidina produc o inhibiţie de 50% în valoarea reducerii de la 460 nm în timp ce amitalul are un efect mai slab . Modificările de absorbţie observate au fost atribuite Fe nehеminic din structura unor proteine ce conţin această

formă de Fe şi interpretate în sensul ipotezei că în complexul I există separat o flavoproteină şi o proteină cu Fe nehеminic. Pe baza acestor date s-a considerat că inhibitorii studiaţi acţionează între aceste două unităţi funcţionale din complexul NADH dehidrogenazic din lanţul respirator. Aceste observaţii nu exclud însă posibilitatea ca în preparatele investigate, prezenţa citocromilor să influienţeze modificările de absorbţie observate la 460 nm în prezenţa inhibitorilor studiaţi.

Pe preparatele de membrană mitocondrială care conţin lanţul respirator complet, piericidina şi rotenona au două locuri de legare specifice, ambele implicate în procesul de inhibiţie şi în plus un loc nespecific de legare care poate contribui la inhibiţie, la concentraţii foarte mici de inhibitor.Inhibiţia NADH coenzima Q reductazei pare să implice numai locurile de legare specifice.(225)

Se poate presupune astăzi că pentru activitatea NADH dehidrogenazelor sînt esenţiale atît componenta proteinică, cît şi componenta lipidică a acestora, implicate în structura locurilor de legare specifice, responsabile pentru interacţiunea dintre componenta flavoproteinică şi coenzima Q.

S-a demonstrat(227) că NADH dehidrogenaza în inimă şi ficat, înainte de a suferi modificări de pe urma procesului preparativ de laborator, are o foarte mică reactivitate faţă de citocromul c, 2,6 diclorfenolindofenol, menadiona, şi coenzima Q, dar că reacţionează foarte rapid

cu fericianura.

Există date care arată că în mitocondriile de inimă, de fapt nu se găsesc în stare nativă decît două enzime ce pot oxida NADH şi anume:

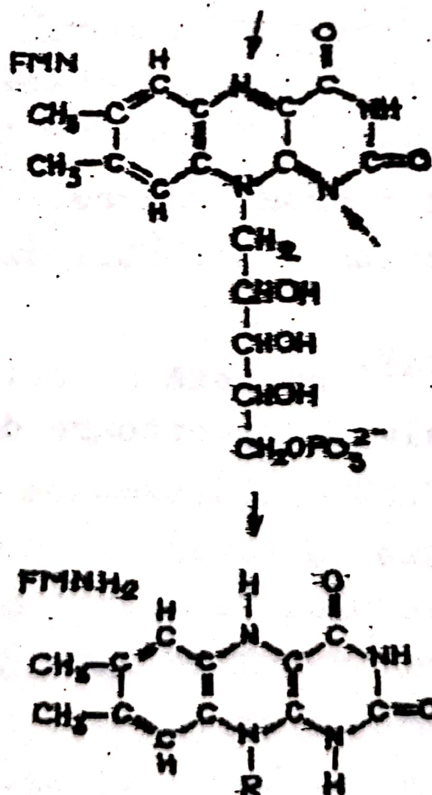
- NADH dehidrogenaza lanţului respirator şi
- Lipoil dehidrogenaza, enzimă care de fapt nu are relaţii directe cu lanţul respirator transportor de electroni şi care are de fapt funcţia de a reduce NAD şi nu de a oxida NADH.[233]

Un criteriu de funcţionalitate al complexului NADH dehidrogenazic, aşa cum am mai arătat este păstrarea semnalului de rezonanţă electronică paranucleară datorat conţinutului în Fe al enzimei. Dispariţia acestui semnal, înseamnă pierderea Fe, a porţiunii din structura proteinică a enzimei ce conţine Fe, pierdere care se observă în tratamentul cu uree, tiouree, enzime proteolitice, în tratamentul cu căldură-acid-etanol al preparatului mitocondrial în procesul, sau mai bine zis în tentativa de izolare a NADH dehidrogenazei.

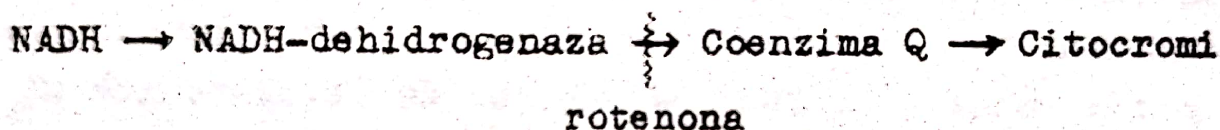
Aceste tratamente duc la transformări moleculare importante a NADH dehidrogenazei, complex enzimatic labil. De pe urma acestor transformări,prin labilizarea porţiunii flavinice, duce la creşterea reactivităţii cu citocromul c şi cu diclorfenolindofenolul(DCPIP). Ori se ştie că una din proprietăţile fundamentale ale flavinelor libere este oxidarea lor rapidă cu citocromul c şi DCPIP.[234,235] In flavoproteine, ca în NADH dehidrogenaza, factorii structurali nu permit aceste interacţiuni.

Datele obţinute cu privire la apariţia activităţii NADH citocrom reductazei după depolimerizarea NADH dehidrogenazei mitocondriale nu exclud total şi posibilitatea existenţei unei astfel de activităţi enzimatice independent de lanţul respirator, asemănătoare NADH şi NADPH citocrom reductazei din microzomi şi citoplasmă sau aceloraşi enzime din surse microbiene.[225]

NADH dehidrogenaza se pare că are un conţinut în FMN de circa 1 mol.FMN pe circa 8 - 10×10^5g proteină şi numai urme de FAD. In unele preparate FAD lipseşte complet.[225] Acceptarea de hidrogeni sub acţiunea NADH dehidrogenazei se face pe nucleul de izoaloxazină al FMN după schema:



După cum am mai arătat, NADH dehidrogenaza denumită şi NADH ubiquinon reductaza,din mitocondrii este o enzimă fosfolipid dependentă,[236,237] şi este complet inhibată de rotenonă şi amital.
Rotenona şi barbituricele întrerup transportul de electroni pe latura dinspre substrat a coenzimei Q întrucît acestea inhibă reducerea coenzimei Q dar nu şi reoxidarea acesteia. Schema dată de Horgan şi Singer[238] ilustrează convingător acest efect:



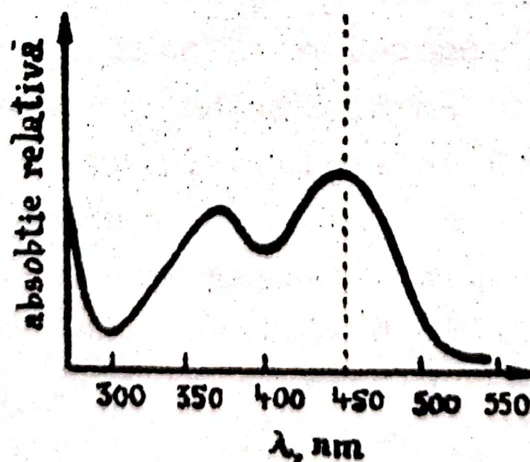
Legarea rotenonei la locul specific de legare de pe enzimă nu este ireversibilă aşa cum a arătat Ernster[232] şi Horgan[239] întrucît după şase spălări ale enzimei maximal inhibate cu rotenonă, în soluţie de 2% serumalbumină bovină, inhibiţia oxidării NADH scade cu 62%

Cremona[219] pe bază de calcul ajunge la concluzia că particulele transportoare de electroni (ETP) au un conţinut în NADH dehidrogenaza de aprox.40m/u mol pe gram. Concentraţia de rotenonă care se leagă la locul specific al moleculei de enzimă este de acelaş ordin de mărime cu conţinutul de NADH dehidrogenază.

Este de menţionat că deşi în procesul de oxidare sau de reducere a grupărilor prostetice FMN sau FAD din structura flavindehidrogenazelor, se prezintă

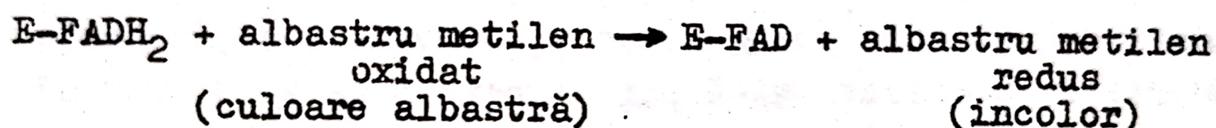
formal ca o reacţie implicînd un transfer simultan de doi atomi de hidrogen sau de doi electroni, există date care arată că aceste reacţii au loc în etape separate şi succesive de transport de cîte un electron. Transportul unui singur electron pe structura FMN din structura NADH-dehidrogenazei duce la formarea semichinonei FMN, radical liber care conţine un electron nepereche şi care poate fi detectat prin spectroscopie de rezonanţă electronică paramagnetică de spin, metodă cu ajutorul căreia se pot detecta moleculele cu un spin electronic nepereche, după comportamentul în cîmp magnetic.

NADH-dehidrogenazele care sînt enzime flavinice sînt intens colorate şi pot fi roşii, brune sau verzi avînd un peak de absorbţie în jur de 370 nm şi un altul în jur de 450 nm. Dacă enzimele sînt reduse enzimatic sau chimic, acestea se decolorează nemaiprezentînd absorbţie la 450 nm.



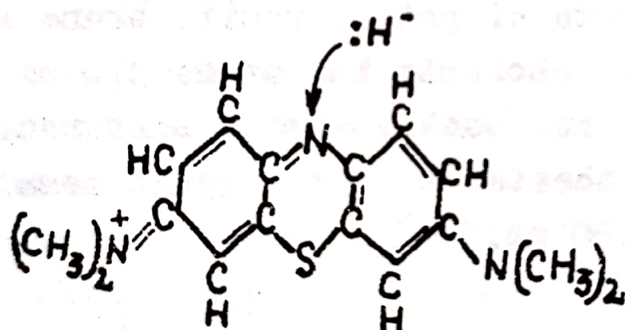
Spectrul de absorbţie al formei oxidate a flavin dehidrogenazelor

Flavin dehidrogenazele reduse sînt uşor oxidate de către acceptori de electroni artificiali, ca fericianura sau de către coloranţi reducători, albastru de metilen, fenazin-metosulfat, 2,6-diclorfenolindofenol (DCPIP). Acceptori artificiali de electroni care acţionează după schema:

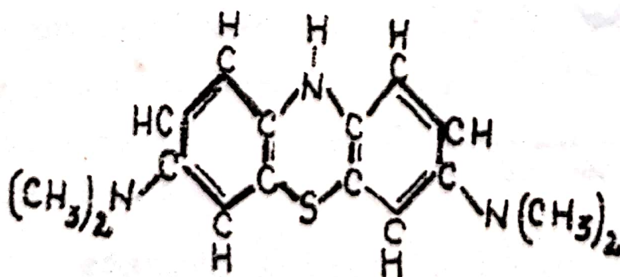


E-FADH$_2$ + albastru metilen oxidat (culoare albastră) ⟶ E-FAD + albastru metilen redus (incolor)

sînt folosiţi larg în diferite metode colorimetrice de dozare a dehidrogenazelor flavin-dependente.

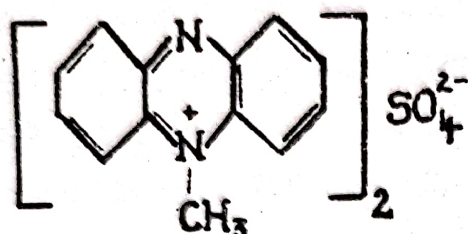


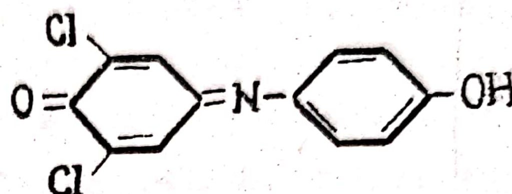
Forma oxidată
(albastră)



Forma redusă
(leuco)-incoloră

In acelaşi mod reacţionează şi fenazin-metosulfat şi 2,6-diclorfenolindofenol:





Fenazin-metosulfat 2,6-Diclorfenolindofenol

<u>Proteine cu fer-neheminic din mitocondrie</u>

Sistemul de transport de electroni mitocondrial implică două clase de compuşi ce conţin fer şi anume: citocromii şi proteinele cu fer neheminic (non-haem proteins).Fer sub formă de depozit ça -feritina- de asemeni poate fi găsit în mitocondrii.

Enzima -ferochelataza- care participă în inserţia ferului în porfirine este localizată pe faţa internă a membranei interne mitocondriale [263] şi foloseşte ionii de fer numai în forma redusă.[264]
Şi aconitaza, o enzimă a ciclului Krebs, necesită tot fer pentru activitate[265] şi, ca şi ferochelataza este situată în interiorul matricei mitocondriale.

Date experimentale arată că reducerea ferului feric şi a complexelor acestuia, are loc pe faţa internă a membranei mitocondriale interne în apropierea ferochelatazei. Reducerea se face fie cu flavoproteine, fie cu ajutorul succinat dehidrogenazei, fie cu ajutorul NADH-dehidrogenazei.[266]

Proteinele cu fer neheminic sînt în general legate de NADH-dehidrogenaza din lanțul respirator, au o greutate moleculară între 6000 și 12000, și izolarea și purificarea lor este posibilă. Nu este încă suficient de clar rolul acestor proteine cu fer neheminic în transportul de electroni și dacă acestea constituie unități moleculare independente, sau sînt subunități ale dehidrogenazelor flavin-dependente.

Proteinele cu fer neheminic conțin 2-8 atomi de fer pe moleculă și un număr echivalent de resturi de cisteină, la care ferul este legat prin legături insuficient clarificate. Tratamentul proteinelor cu fer neheminic, cu acizi, duce la eliberarea sulfului sub formă de H_2S. Aceste proteine pot fi reduse chimic sau enzimatic, dar nu se știe exact cum are loc acest proces. De obicei, reducerea acestor proteine, este o fază cu un electron și este asociată cu o înegrire a formei oxidate care este de culoare roșie sau roz. Această reducere duce la apariția unui peak la 450 nm și a unui semnal caracteristic de rezonanță electronică paramagnetică de spin.

Proteine cu fer neheminic participă activ în procesul de fotosinteză și în procesul de fixare de azot.

Comparînd viteza de reducere a Fe^{3+} de către mitocondriile întregi de ficat de șobolan, cu aceea a mitocondriilor tratate cu ultrasunete, se vede că reducerea ferului are loc în interiorul mitocondriilor și lipsește în fracțiunea matricială solubilă, arătînd

deci că reducerea ferului este o proprietate a feței interne a membranei mitocondriale.[266]

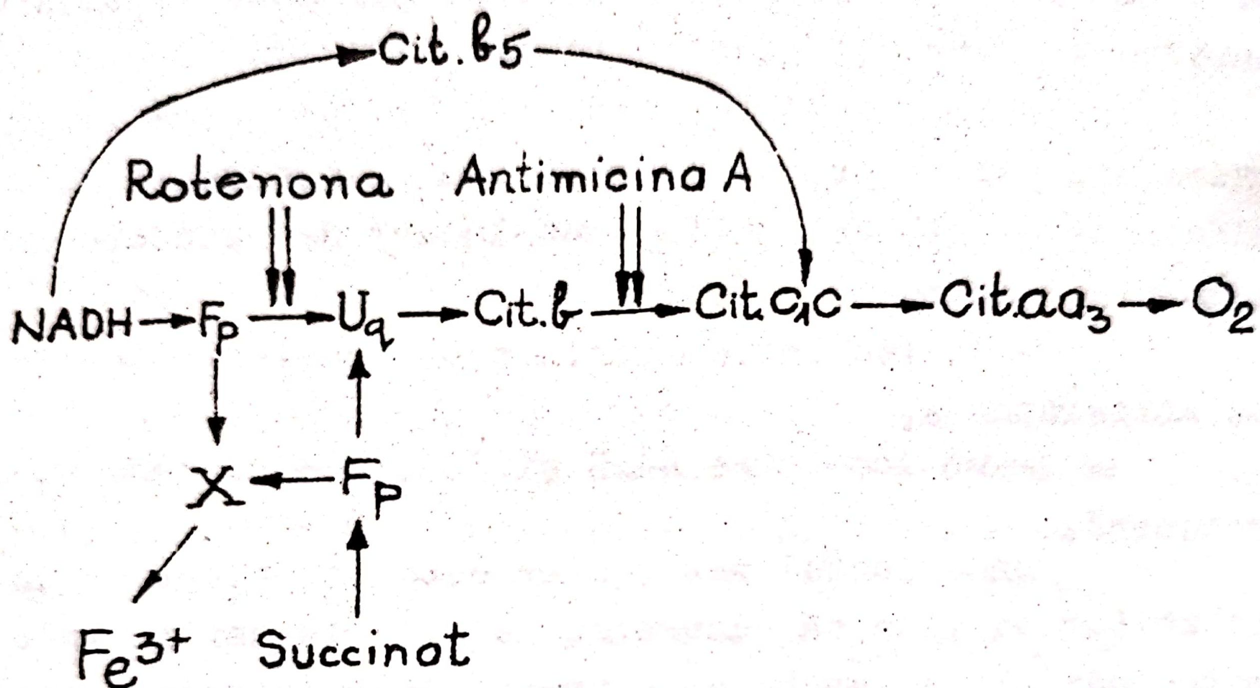
Compușii cu fer sînt reduși de către lanțul respirator și nu printr-un mecanism independent. Se consideră că există cel puțin două locuri de reducere a ferului și anume:

- un loc între succinat și locul de blocare cu antimicină A,
- un loc între NADH și locul de blocare cu rotenonă.

Dacă lanțul respirator este întrerupt cu un inhibitor se vede că adăugarea de Fe^{3+} la particulele mitocondriale anaerobe este urmată de o oxidare a citocromului b.

Locul de interacțiune între Fe^{3+} și lanțul respirator este flavoproteina NADH-dehidrogenaza și succinat-dehidrogenaza.

Din schema[266] care urmează se vede că în mitocondriile tratate cu ultrasunete, transportul de electroni de la NADH și succinat poate să fie localizat fie în întregime pe fața internă a membranei interne și în acest caz este inhibat cu rotenonă și antimicină A, fie într-un sistem în care prin intermediul citocromului b_5 de pe fața externă, oxidarea NADH ocolește fazele inhibiției cu rotenonă și antimicină A și deci este insensibilă la acești doi inhibitori.



Transportul de electroni de la NADH și succinat în mitocondrii după tratament cu ultrasunete.

X = intermediar neidentificat
Uq = ubiquinona
F_p = flavoproteină

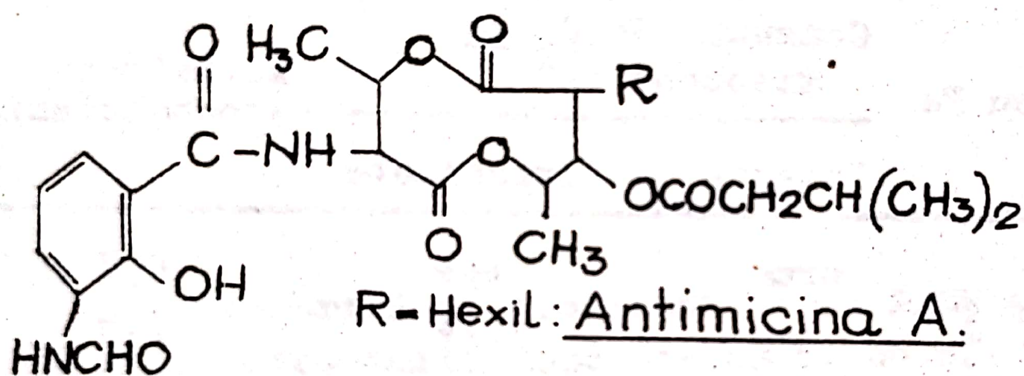
Din tabelul care urmează se vede că numai un număr restrîns de compuși cu fer pot traversa membrana mitocondrială pînă la locul de reducere a ferului.

Disponibilitatea ferului din diferite complexe pentru reducerea de către mitocondriile de ficat de şobolan intacte sau tratate cu ultrasunete sau pentru activitatea ferochelatazei din mitocondriile tratate cu ultrasunete.
(Reducerea ferului măsurată prin consumul de oxigen.Activitatea ferochelatazei dată în nmoli hem-deuteriu/min./mg proteină).

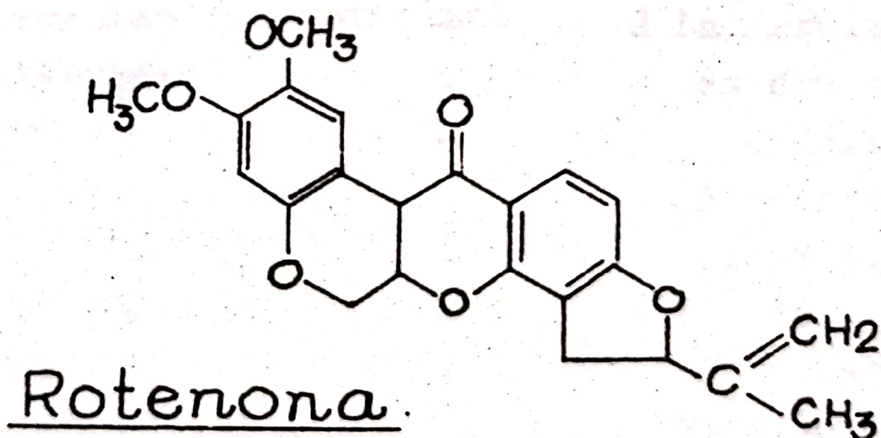
Compusul cu Fe	Consumul de O_2 în mitocondrii		Activitate ferochelatazică
	Intacte	+ ultrasunete	
$FeCl_3$	urme	+++	0,7
Ferioxamină G	+++	+++	0,5
Ferioxamină B	urme	+	0,5
Ferioxamină D	-	-	-
Ferirubină	-	urme	-
Fericrom	-	-	-
Fericrom A	-	-	-
Fericrisin	-	-	-
Ferocen	-	-	-
Imferon	-	-	urme
Transferină	-	-	-
Feritină	-	-	-
Feredoxină	-	-	-

+ = circa 15 ng atom O/min./mg proteină
+++ = circa 50 ng atom O/min./mg proteină

Se vede că numai ferioxamina G şi mai puţin ferioxamina B pot fi reduse în mitocondrii, sau de către particulele mitocondriale, în timp ce ceilalţi transportori de fer microbieni sau complexe cu fer ca: transferina şi feritina de la mamifere sînt insuficiente. Reducerea ferioxaminei G şi B nu este inhibată cu rotenonă şi antimicina A, la fel nu este inhibată nici reducerea $FeCl_3$.



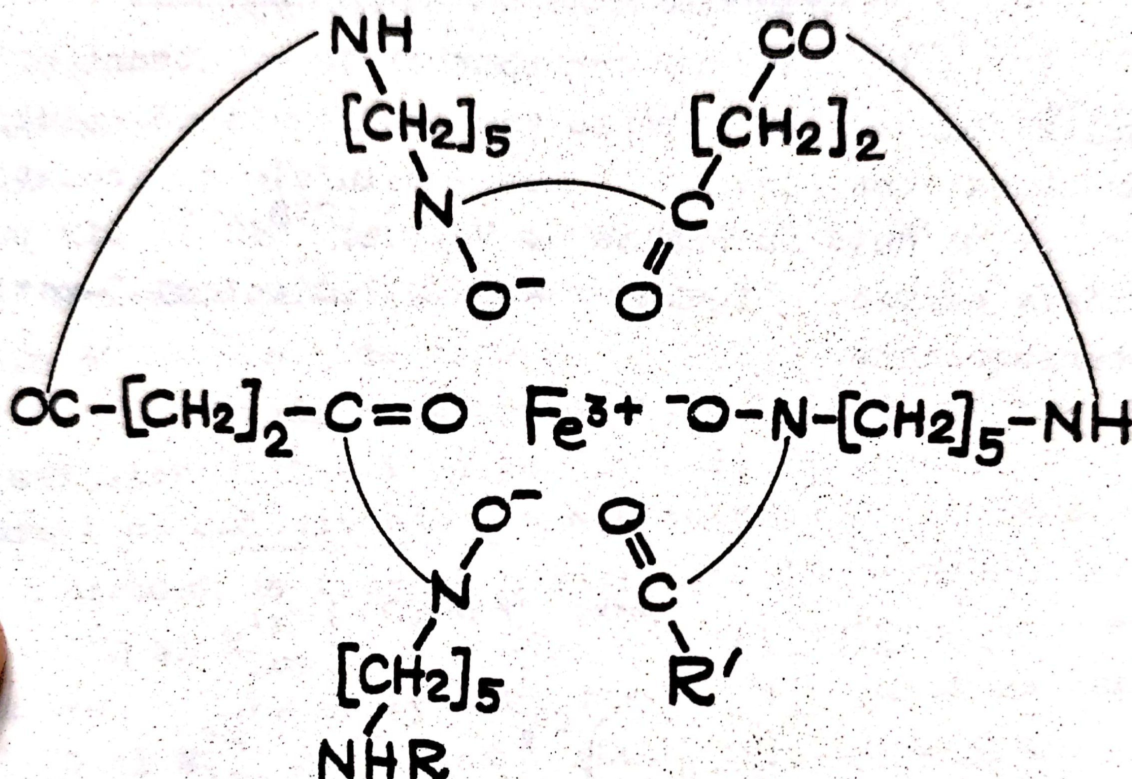
R-Hexil: Antimicina A.



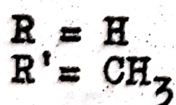
Rotenona.

Aceasta arată că Fe^{3+} este redus primar de citocromul b, oxidarea căruia nu este sensibilă la antimicina a şi rotenona, aşa cum am arătat mai înainte.

Redăm mai jos structura ferioxaminelor (G,B,D):

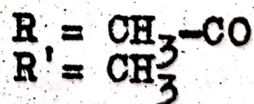


Ferioxamina B



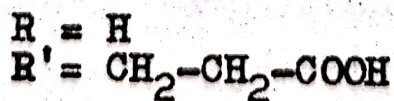
R = H
R'= CH_3

Ferioxamina D_1



R = CH_3-CO
R'= CH_3

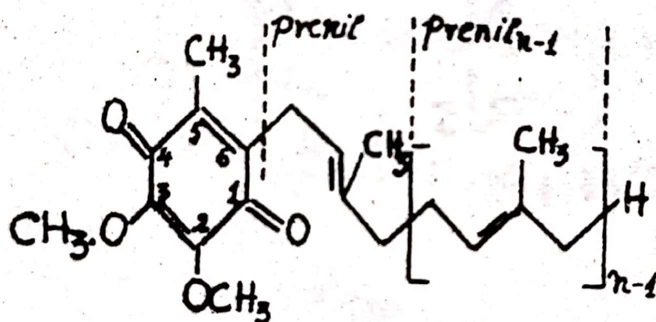
Ferioxamina G



R = H
R'= CH_2-CH_2-COOH

Coenzima Q şi lanţul respirator

In legătură cu transportul de electroni prin lanţul respirator un interes deosebit prezintă coenzima Q sau ubiquinona, găsită în toate celulele şi izolată pentru prima dată în Anglia de Morton.[278,279] Din punct de vedere chimic, ubiquinona este 2,3.dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona:



Ubiquinona

Mai importante sînt două forme de ubiquinone şi anume: coenzima Q_6 şi Coenzima Q_{10} (CoQ_{10}). Coenzima Q_{10} este un derivat de benzoquinonă cu o catenă laterală izoprenoidă lungă, pe care o găsim în special în celulele animale. Această formă conţine 10 resturi de izopren (prenil). In celelalte organisme, se găsesc coenzima Q_6

şi coenzima Q_8 cu 6 şi respectiv cu 8 resturi de izopren.

Coenzima Q_{10} mai poartă denumirea şi de ubiquinona-50 întrucît cele 10 resturi izoprenoide care constituie catena laterală conţin 50 de atomi de carbon.

Coenzima Q_6 poartă denumirea de ubiquinonă - 30 deoarece catena laterală izoprenoidă este formată din din 30 de atomi de carbon.

Studiind proprietăţile fizico-chimice ale diferiţilor derivaţi de ubiquinonă, Pennock şi Morton(280) arată că ubiquinona-50 are greutatea moleculară = 863 un procent de grupări metoxi de 7,19, punctul de topire 48,5°C şi $E^{1\%}_{1cm}$ la 272 nm = 167. Ubiquinona-40 are gr. molec. = 727, grupări metoxi 8,53% , punct de topire la 37°C şi $E^{1\%}_{1cm}$ la 272 nm = 206. Ubiquinona-30 are gr. moleculară = 591, grupări metoxi 10,5%, punct de topire 19,2°C şi $E^{1\%}_{1cm}$ la 272 nm = 246.

Analizînd conţinutul în ubiquinonă în diferite organe, la peşte, s-a constatat la cod, un conţinut mai mare de ubiquinonă în inimă (49 µg/g), mai mic în ficat (2,6 µg/g) şi foarte mic în muşchi (0,24 µg/g). Spectrul în infraroşu al ubiquinonei din inimă de cod, este identic cu acela al ubiquinonei-50 din inimă de cobai.(280)

Examinînd conţinutul în ubiquinonă al inimii la diferite specii de mamifere, s-a ajuns la concluzia că importante cantităţi de ubiquinonă sînt conţinute

endogen în cord și că odată cu creşterea gradului de dezvoltare evoluţionară biologică, se constată şi o creştere a conţinutului endogen în ubiquinonă a cordului.[281]
Astfel la insectivore ca erinaceide, conţinutul în ubiquinonă în ininmă este de 23,5-108 μg/g ţesut umed, în ficat 12-19 μg/g, în intestin 25,3 μg/g ţesut umed, la rozătoare (şobolan): în inimă 199,3 μg/g ţesut umed, în ficat 77 μg/g ţesut umed, în intestin 63,7 μg/g ţesut umed, iar la carnivore (vulpe) în inimă 240,6 μg/g ţesut umed, în ficat 86,3 μg/g ţesut umed, în intestin 24,3 μg/g[281].
Şi la păsări există variaţii în conţinutul în ubiquinonă a diferitelor organe. Astfel, din tabelul de mai jos se vede bine acest lucru:

Conţinutul în ubiquinonă la păsări

	μg/g ţesut umed		
	Inimă	Ficat	Intestin
Găină domestică	18,0	13,0	1,4
Porumbel	174,5	31,3	317,8
Canar	242,3	52,0	38,0

Este posibil ca întregul conţinut al ţesuturilor în ubiquinonă să fie folosit pentru respiraţia

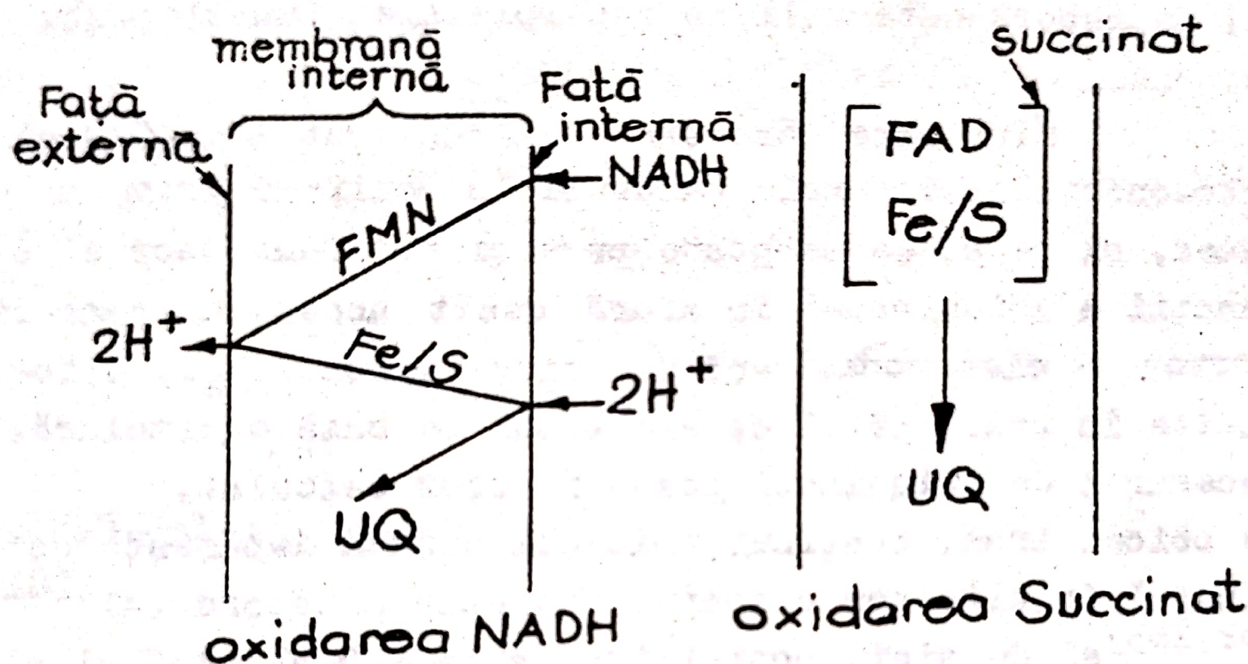
celulară. In principiu, se ştie că mitocondriile din diferite ţesuturi au o compoziţie şi funcţii similare, deaceea diferenţe cantitative în CoQ al ţesuturilor ar putea fi puse pe seama numărului de mitocondrii. Un astfel de raport este util în interpretarea funcţiei ubiquinonei.

Sînt date care arată că conţinutul în CoQ al mitocondriilor în unele ţesuturi la mamifere este în exces, şi de aceea se poate pune şi problema unor alte funcţii a ubiquinonei în afară decît aceea de transportor de electroni. Dacă CoQ şi citocromul c sînt folosite în transportul de electroni pe bază echimolară, necesarul de ubiquinonă poate fi uşor calculat.
De obicei însă, conţinutul în ubiquinonă depăşeşte conţinutul în citocrom c, compus exclusiv mitocondrial[281, 282,283] şi de aici, posibilitatea ca CoQ să aibă şi alte funcţii în afara aceleia de transportor de electroni.

Ubiquinona se găseşte în celulele vertebratelor, nevertebratelor, plantelor superioare, algelor şi într-un număr mare de bacterii şi microorganisme.[281, 284,285,286] Rolul acestui compus rămîne încă insuficient clarificat.

Incă în 1967, Kröger şi Klingenberg[287] arată că ubiquinona-10 este un transportor respirator comun pentru oxidarea atît a NADH cît şi a succinatului, şi că sinteza de 1 mol. ATP din ADP şi P_a este cuplată cu reducerea a 1 mol de ubiquinonă -10 de către NADH dar nu şi de succinat.

Lawford[288] arată că ubiquinona-10 acţionează ca acceptor pentru complexul Fe-S-flavoproteinic al NADH dehidrogenazei şi succinat dehidrogenazei după schema:



FMN - gruparea prostetică a NADH dehidrogenazei

FAD - gruparea prostetică a succinat oxidazei

Fe/S - fier - sulf - proteină

UQ = ubiquinona

Pe baza studiilor experimentale, se poate afirma că activitatea NADH ubiquinon reductazică sensibilă la rotenonă poate fi organizată în lanţul respirator ca etapă oxidoreducătoare proton-translocatoare.

Astfel de locuri în care găsim translocare de

protoni în lanțul respirator au fost descrise de Mitchell și Moyle.[289,290]

Reducerea rotenon sensibilă a ubiquinonei de către NADH mitocondrial este asociată cu translocarea de protoni.

In ceea ce privește biosinteza ubiquinonei în plantele superioare, alge și fungi, s-a demonstrat că precursor pentru această sinteză servește acidul p-hidroxibenzoic.[291,292,293,294]

Recent s-a observat încorporarea în ubiquinonă la unele plante a acidului cinamic și a acidului p-cumaric, compuși ce servesc ca precursori pentru acidul p-hidroxibenzoic.[295,296]

Urmărindu-se sinteza cu acid [U ^{14}C] -cinamic și cu acid [U ^{14}C] -cumaric, s-a observat că peste 90% din radioactivitate este regăsită în molecula de ubiquinonă și anume, în ciclul p-benzoquinonic.

In celule de drojdie, acidul p-hidroxibenzoic se formează din acid chorismic și apoi se încorporează în ubiquinonă.[292]

S-a observat că acidul p-hidroxibenzoic este precursor în biosinteza de ubiquinonă în bacteriile Gram negative fotosintetice și nefotosintetice.[297,298] Căile de metabolizare ale acidului p-hidroxibenzoic pînă la ubiquinona-10 au fost clarificate abia după ce Friis și Folkers[301] izolează din bacteriile fotosintetice Rhodospirillum rubrum, o serie de fenoli și quinone substituite cu resturi de decaprenil. Din schema următoare se vede sinteza de ubiquinonă din acid p-hidroxibenzoic.[301]

CO_2H | CO_2H

OH | OH | OH | HO, OH, R

acid p-hidroxi-benzoic → 4-carboxi-2-poliprenil-fenol → 2-poliprenil-fenol → [6-hidroxi-2-poliprenil fenol]

R = {CH₂–CH=C(CH₃)–CH₂}ₙH

3-metil-2-poliprenil-1,4-benzochinonă

CH_3O, OH, R

6-metoxi-2-poliprenil fenol

CH_3O, CH_3, R, O

ubichinonă ← 5-hidroxi-6-metoxi-3-metil-2-poliprenil 1,4-benzochinonă ← 5-dimetoxi-ubichinonă ← 6-metoxi-2-poliprenil-1,4-benzochinonă

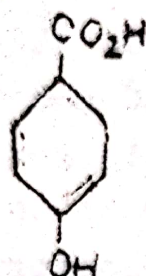
Chester(303) studiind sinteza de ubiquinonă la Pseudomonas ovalis, plecînd de la acid p-hidroxi- - U ^{14}C -benzoic a observat că această sinteză este complet inhibată în lipsa oxigenului, cu toate că un grad oarecare de radioactivitate este încorporat în 2-poliprenil fenol.

De aici concluzia că oxigenul atmosferic este indispensabil pentru sinteza de ubiquinonă.

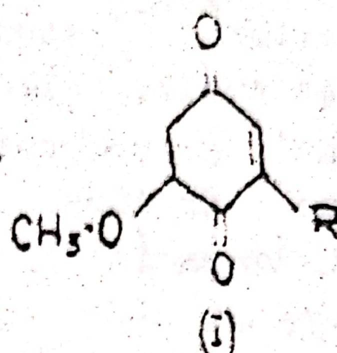
Preparatele acelulare par să nu fie capabile să sintetizeze ubiquinona din acid p-hidroxibenzoic şi integritatea celulară pare să fie de asemenea o condiţie obligatorie pentru sinteză.(303)

In micelii de Aspergillus flavus, prin studii de spectroscopie în ultra violet, cromatografie în strat subţire, studii de spectrometrie de masă, şi prin studii genetice, folosind ca precursor acidul p-hidroxibenzoic, s-au identificat o serie de precursori în sinteza de ubiquinonă - 10 care pot fi postulaţi ca intermediari şi într-un număr de bacterii, drojdii,etc.

Din schema care urmează, se vede această cale de biosinteză a ubiquinonei în Aspergillus flavus. (304)



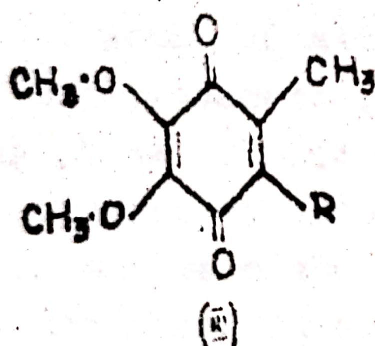




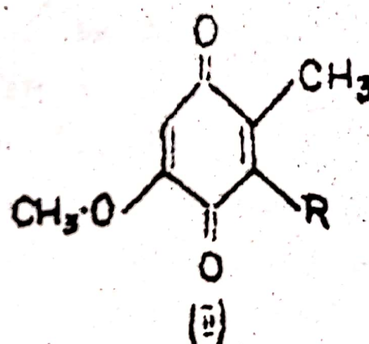
Ac.p-hidroxi-
benzoic

5-Metoxi-2-
decaprenil(X.H_2)-1,4-
benzoquinonă



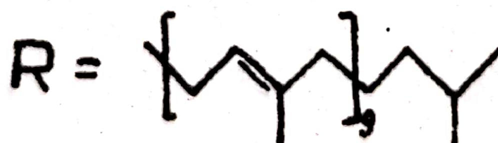






Ubiquinona-10(XH_2)

**5-Demetoxi-
ubiquinona-10(X.H_2)**



Calea parţială din biosinteza ubiquinon - 10(X-H_2) în Aspergillus flavus.

In ceea ce privește studiul sintezei ubiquinonei în țesuturile animale, s-a folosit de asemenea ca precursor acidul p-hidroxibenzoic.
Precursori obișnuiți în sinteza ubiquinonei la bacteriile fotosintetice ca 2-poliprenil fenolii, 6-metoxi-2-poliprenil fenolii, 6-metoxi-2-poliprenil-1,4-benzoquinona, și 5-demetoxiubiquinonele, nu au fost găsiți în țesuturile unui important număr de specii de păsări și mamifere.[305]
Rezultate similare au fost obținute și în studii cu un număr important de plante superioare[306] și fungi.[304]

In 1966 Olson[306] demonstrează prezența în ficatul de șobolan a unui precursor al ubiquinonei-9 care absoarbe razele U.V. și care în timp, este supus unei oxidări într-un compus de culoare galbenă care absoarbe lumina la 272 nm, și care poate fi redus cu borohidrida de sodiu. Dacă felii de ficat de șobolan sînt incubate cu 1-^{14}C-benzoat, ^{3}H-benzoat, L-metionina-^{14}C, DL-acid mevalonic, U-^{14}C-tirozină, acest precursor al ubiquinonei-9 devine radioactiv. Acest compus a fost izolat și identificat[307] ca 5-dimetoxiubiquinona-9. Acesta în timpul preparării și conservării, se transformă în diferite tipuri de ubiquinone, inclusiv în ubiquinona-9, observată de Olson.[306,308]

Faptul că în marea majoritate a țesuturilor animale studiate, ca și în bacterii, alge, plante superioare și fungi, găsim cel puțin două ubiquinone, arată lipsa unei specificități absolute a enzimelor im-

plicate în sinteza ubiquinonelor la nivelul procesului de prelungire a lanţului izoprenoid.

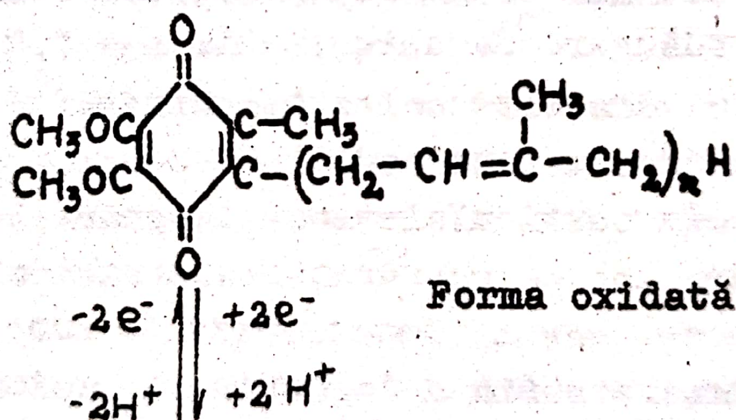
Pentru biosinteza ubiquinonei-9 în cupe de ficat de şobolan, acetatul şi mevalonatul, servesc ca precursori ai catenei laterale poliizoprenoide în timp ce nucleul de benzoquinonă poate proveni din fenilamino acizi, pe o cale care implică derivaţi de benzoat ca intermediari.

Urmărind sinteza de ubiquinonă, pornindu-se dela U-^{14}C-fenilalanină şi U-^{14}C-tirozină, s-a observat că aceasta se face printr-un mecanism deosebit de complex. Complexitatea acestui mecanism rezultă din faptul că metabolizarea amino acizilor poate duce la formarea de derivaţi de benzoat care pot furniza ulterior nucleul de quinonă iar pe de altă parte, fenilamino-acizii pot fi metabolizaţi pe o cale ce duce la formarea de acid homogentizinic, acetoacetat şi mevalonat, compuşi ce pot fi încorporaţi în lanţul lateral izoprenoid al ubiquinonei(313, 314,315,308)

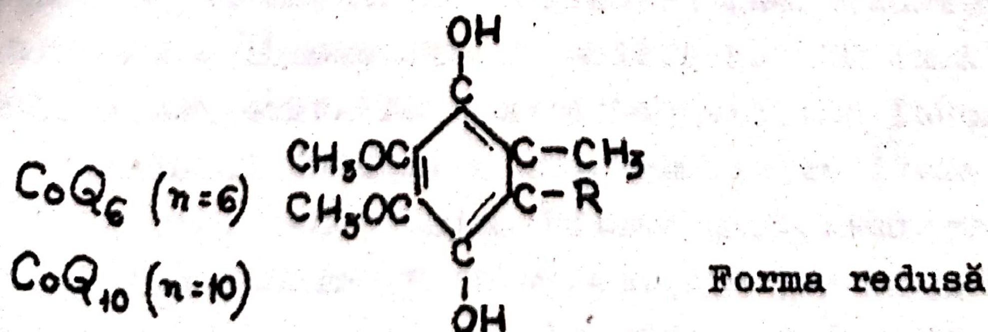
Aiyar(313) arată că biosinteza ubiquinonei-9 în ficatul de şobolan este limitată de viteza de formare a mevalonatului necesar în sinteza lanţului lateral izoprenoid. După iradiere totală, sau după administrare de actinomycină D, se constată o creştere a activităţii 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductazei, enzimă care sintetizează mevalonatul. In felul acesta, atît sinteza de ubiquinonă-9 cît şi sinteza de colesterol, au o etapă limitantă comună şi anume reducerea 3-hi-

droxi-3-metilglutaril CoA la mevalonat.Vanadium inhibă mai puternic sinteza de ubiquinonă-9 atunci cînd se folosește ca precursor 1-^{14}C-benzoat,decît atunci cînd precursor este 2-^{14}C-mevalonatul.Foamea are oarecum un efect asemănător asupra sintezei de ubiquinonă și colesterol cu acel al vanadiului.[316,317,318] O serie de investigații arată că ubiquinona este un transportor de electroni obligator în lanțul respirator iar Kröger și Klingerberg[287] consideră CoQ un transportor în lanțul respirator ce funcționează ca moleculă liposolubilă de legătură între flavoproteine și sistemul citocromic in faza lipidică a membranei mitocondriale.

Lehninger[309] prezintă așa cum se vede mai jos, modul în care CoQ participă în transportul de electroni mitocondrial.



Forma oxidată



Forma redusă

Forma oxidată a coenzimei Q are un maxim de absorbţie între 280 - 289 nm.

Participarea coenzimei Q în lanţul respirator este demonstrată şi prin inhibiţia lanţului respirator, în porţiunea dintre NADH dehidrogenază şi citocromul b, cu antibioticul piericidina care are o structură asemănătoare cu aceea a CoQ.

In legătură cu participarea ubiquinonei în lanţul respirator, părerile sînt contradictorii. Argumente în sprijinul participării ubiquinonei în lanţul respirator, au fost aduse de Lester[310] şi Szarkowska[311] care au arătat că extracţia ubiquinonei din particulele submitocondriale, duce la inactivarea sistemelor succinat oxidazic şi NADH oxidazic, inactivare care este reversibilă la adăugare de ubiquinonă.

Reluînd aceste cercetări, Ernster[312] demonstrează că inactivarea sistemului NADH-oxidazei şi succinat oxidazei, în particulele submitocondriale lipsite de ubiquinonă, are loc pe suprafaţa substratului a citocromului b.

O demonstraţie a faptului că după extracţia ubiquinonei schimbări majore au loc în lanţul respirator în regiunea dintre flavoproteine şi citocromul b este ilustrată de faptul că flavoproteinele ca atare rămîn active, aşa cum arată experimente care implică folosirea de N,N,N'N' - tetrametil-p-fenildiamină (TMPD), şi de faptul că etapa din lanţul respirator de la citocromul b la oxigen este funcţional integră, aşa cum demonstrează

folosirea menadiolului ca substrat. Menadiolul este un substrat care reduce citocromul b neenzimatic.[312]

In general se poate spune că ubiquinona este esențială pentru interacțiunea succinat dehidrogenazei și NADH dehidrogenazei cu citocromul b și că această interacțiune reprezintă o etapă importantă în funcția normală a catenei respiratorii.

Urban și Klingenberg[319] demonstrează că ubiquinona din lanțul respirator este localizată în așa fel încît porțiunea benzoquinonică este ieșită din faza lipidică a membranei mitocondriale, în care catena izoprenoidă a ubiquinonei este imersată. Această concepție este în deplin acord cu datele care arată că reacțiile redox din lanțul respirator, au loc într-un mediu apos întrucît acestea sînt puternic inhibate dacă apa este înlocuită cu D_2O sau cu glicerol.[320]

Potențialul redox al ubiquinonei din particulele submitocondriale, s-a determinat printr-o echilibrare cu sistemul succinat/fumarat la circa 65mV la pH 7,0 cu un raport redox, n = 2

Potențialul redox al ubiquinonei legate, este = 66 mV la pH 7,0 în timp ce potențialul redox al ubiquinonei izolate determinat în soluție etanol-HCl este = 104-112mV la pH 7,0. Si potențialul redox al dimetoxi - sau diclor benzoquinonelor este mai scăzut în soluții apoase decît în soluții de etanol sau benzen[321,322] cu circa 10-40 mV. Această poate să indice faptul că porțiunea quinonică a ubiquinonei legată de lanțul respirator este

localizată într-un mediu mai apos decît acela cînd ubiquinona este solvită în etanol, întrucît potențialul redox al ubiquinonei legată de lanțul respirator, este cu 40-60 mV mai scăzut.

Citocromii și lanțul respirator.

Histohematina sau miohematina care a fost descoperită în 1886 de către Mac Munn[324,325,326] a fost denumită în 1925 de către Keilin[327] citocrom.
Sub această denumire sînt cunoscute hemoproteine intracelulare care în formă redusă au optim de absorbție în spectrul vizibil.

In prezent sub denumirea de citocromi, sînt cuprinse toate hemoproteidele intracelulare cu excepția hemoglobinei, mioglobinei, peroxidazei și catalazei.
In această grupă de substanțe intră substanțe care au funcții biologice diferite. Rolul unor citocromi este încă neclar; dar probabil toți citocromii acționează în celulă prin oxidare și reducere. Unii citocromi sînt fermenți, iar alții sînt simpli transportori în procesele de oxidoreducere.

Citocromii pot fi definiți cel mai bine drept componenți intracelulari cu spectre de absorbție asemănătoare hemocromogenului și care participă în transferul de electroni.
In transferul de electroni, atomul de Fe din hem, suferă o oxidare și reducere reversibilă între starea Fe^{3+} și Fe^{2+}. Prin termenul de hemoproteină se înțelege nu

numai feroporfoproteinele dar şi proteine conjugate a căror grupări prostetice sînt chelaţi de fier, sau alţi compuşi structurali asemănători porfirinelor.

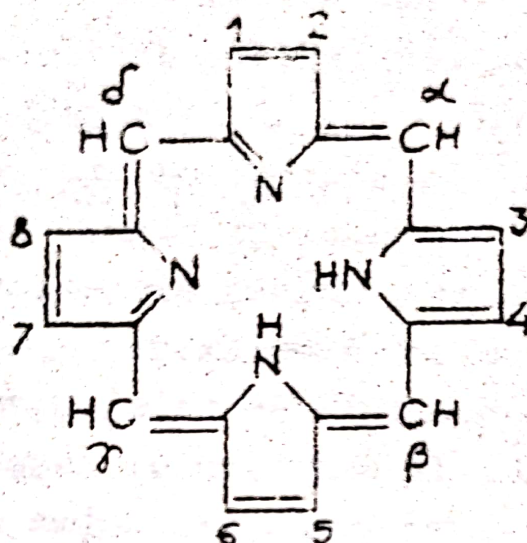
In lanţul respirator, citocromii participă în transferul de electroni de la flavoproteine la oxigenul molecular. Ultimul citocrom din lanţul respirator poate reacţiona cu oxigenul şi poartă denumirea de citocrom oxidază. Formele reduse ale celorlaţi citocromi nu pot fi reoxidate de către oxigenul molecular.

In mitocondriile animalelor superioare şi a celulelor vegetale, la care lanţul respirator a fost mai bine studiat, s-au găsit cel puţin cinci forme diferite de citocromi şi anume: citocromii b,c,c_1,a şi a_3 Raportul dintre diferitele forme de citocromi, pare să fie destul de constant. In alte compartimente celulare au fost găsite şi enzime heminice, altele decît citocromii amintiţi. Astfel citocromul b_5 a fost identificat în reticulum endoplasmatic; citocromi au fost găsiţi şi în microzomi In celulele vertebratelor s-au găsit cantităţi însemnate de enzime heminice, ca peroxidaza şi catalaza, a căror rol în oxidările biologice este încă neclar.

Ciclul porfirinic este prezent nu numai în diferite enzime heminice şi hemoproteine, dar şi în clorofila vegetalelor. Un ciclu porfirinic modificat poate fi găsit şi în structura vitaminei B_{12} (Vitamine hidrosolubile cu rol coenzimatic.Partea I).

Porfirinele sînt derivaţi de porfină, compus

cu structură tetrapirolică, ce nu se găsește în natură.

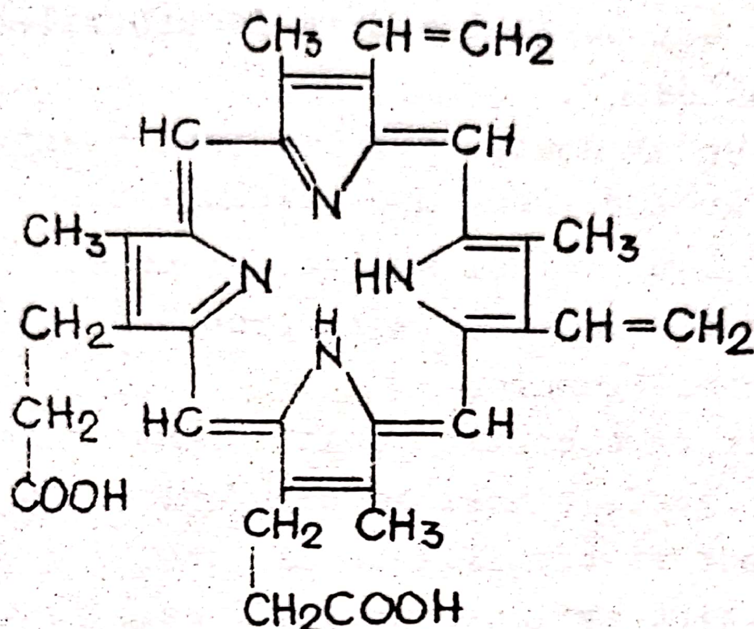


Porfina

Porfirinele sînt clasificate și denumite pe baza substituienților catenei laterale ale acestora în:

- etioporfirine
- mezoporfirine
- protoporfirine
- coproporfirine

Dintre acestea, cel mai frecvent întîlnite sînt protoporfirinele care conțin patru grupări metilice, două grupări vinilice, și două grupări propionice. Intrucît protoporfirinele conțin trei tipuri de substituienți, acestea pot exista în 15 forme izomerice depinzînd de secvența substituției în cele opt poziții. Dintre aceste forme posibile, protoporfirina IX este cel mai des întîlnită și intră în structura hemoglobinei, mioglobinei, și a marei majorități a citocromilor.



Protoporfirina IX
(1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinil-
6,7-dipropionil-porfină)

Sînt două sisteme de nomenclatură pentru izomerii porfirinei, bazate pe raportul fiecărei porfirine în parte, față de izomerii etioporfirinici sau mezoporfirinici. Dacă fiecare ciclu pirolic al porfirinei conține un substituient metilic și un substituient etilic, etioporfirinele rezultate, pot exista în patru forme izomere, indicate în tabelul care urmează, ca tipul I-IV.

O porfirină este considerată de tipul I,II,III, sau IV, în funcție de ce fel de tip de etioporfirină rezultă dacă lanțurile laterale ale porfirinei, sînt convertite în grupări metilice sau etilice, prin procedee

Rusu M

chimice. Astfel, uro - şi coproporfirinele pot fi convertite în etioporfirine prin decarboxilarea lanţurilor laterale acide.

Un al doilea sistem, este bazat pe izomeria mezoporfirinelor. Dacă două cicluri pirolice conţin substituienţi metilici şi etilici şi celelalte două, conţin substituienţii metil şi acid propionic, pot rezulta 15 mezoporfirine izomere.

Porfirinele care conţin substituienţi care pot fi convertiţi în aceia a unei mezoporfirine sau a unui izomer similar, pot fi clasificate ca tipul 1 - 15. Astfel, o protoporfirină obţinută natural, este convertită în tipul IX, mezomerul de porfirină, prin reducerea grupărilor vinilice ale acesteia.

Compuşii 1 - 8 din tabelul care urmează, reprezintă tipurile izomerice raportate la etioporfirină, iar compuşii 9 - 21 din tabel, sînt tipurile izomerice raportate la mezoporfirină.

Porfirinele naturale (protoporfirina), sînt clasificate în literatură, ca tipul III sau tipul IX, în funcţie de sistemul de referinţă a nomenclaturii folosit.

Dnoisin

Denumirea şi structura porfirinelor[328]

Porfirine	Substituienţi în poziţiile							
	1	2	3	4	5	6	7	8
-Etioporfirina I	Me	Et	Me	Et	Me	Et	Me	Et
-Etioporfirina II	Me	Et	Et	Me	Me	Et	Et	Me
-Etioporfirina III	Me	Et	Me	Et	Me	Et	Et	Me
-Etioporfirina IV	Me	Et	Et	Me	Et	Me	Me	Et
-Uroporfirina I	AcOH	Pr	AcOH	Pr	AcOH	Pr	AcOH	Pr
-Uroporfirina III	AcOH	Pr	AcOH	Pr	AcOH	Pr	Pr	AcOH
-Coproporfirina I	Me	Pr	Me	Pr	Me	Pr	Me	Pr
-Coproporfirina III	Me	Pr	Me	Pr	Me	Pr	Pr	Me
- Mezoporfirina IX	Me	Et	Me	Et	Me	Pr	Pr	Me
- Protoporfirina IX	Me	V	Me	V	Me	Pr	Pr	Me
- Deuteroporfirina IX	Me	H	Me	H	Me	Pr	Pr	Me
- Hematoporfirina IX	Me	B	M	B	M	P	P	M
- Clorocruoroporfirina	M	-CHO	Me	V	Me	Pr	Pr	Me
- Piroporfirina XV	Me	Et	Me	Et	Me	H	Pr	Me
- Rodoporfirina XV	Me	Et	Me	Et	Me	-COOH	Pr	Me
- Deuteroporfirin-IX-2,4 - disulfonic acid	Me	$-SO_3H$	Me	$-SO_3H$	Me	Pr	Pr	Me
- 2,4-Diacetildeutero - porfirina IX	Me	Ac	Me	Ac	Me	Pr	Pr	Me

- 4-Formildeuteroporfirina IX	Me	H	Me	CHO	Me	Pr	Pr	Me
- 2,4-Diformildeutero-porfirina IX	Me	CHO	Me	CHO	Me	Pr	Pr	Me
- Deuteroporfirina-IX-2,4-diacrilic acid	Me	Acr	Me	Acr	Me	Pr	Pr	Me

Prescurtări în lanţul lateral: M, $-CH_3$

E, $-CH_2CH_3$

AcOH, $-CH_2COOH$

Pr, $-CH_2CH_2COOH$

V, $-CH = CH_2$

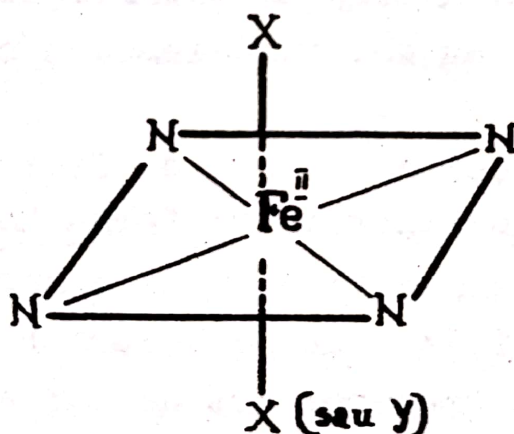
B, $-CHOHCH_3$

Ac, $-COCH_3$

Acr, $-CH = CHCOOH$

Protoporfirinele formează complexe chelatate quadridentate, cu ioni metalici ca Fe,Mg,Zn,Ni,Co,sau Cu. Un astfel de complex chelatat al protoporfirinei cu FeII poartă denumirea de protohem sau mai simplu, hem. Un complex similar al protoporfirinei cu Fe III poartă denumirea de hemină sau hematină.

In hem cele 4 grupuri de liganzi ai porfirinei formează un complex pătrat-planar cu Fe; poziţiile 5 şi 6 coordinative ale Fe rămase libere sînt perpendiculare pe planul ciclului porfirinic. Dacă poziţiile 5 şi 6 ale Fe sînt ocupate, structura rezultată poartă denumirea de hemocrom sau hemocromogen.



Hemocrom

In proteinele heminice, mioglobina şi hemoglobina, poziţia 5 este ocupată de către o grupare imidazolică a unui rest de histidină. In aceşti compuşi, poziţia 6 nu este ocupată (deoxihemoglobina şi deoxi-mioglobina) sau ocupată de oxigem ((oxihemoglobina şi

oximioglobina) sau de alţi liganzi ca: CO sau CN,etc.

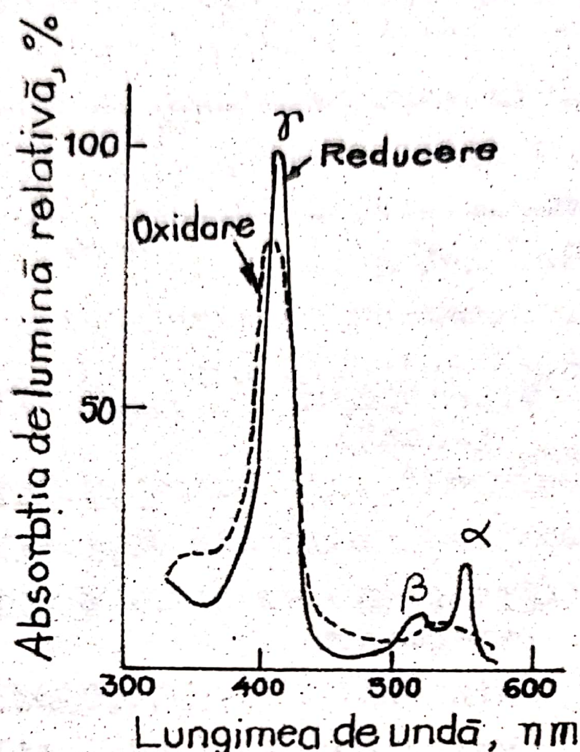
Pe de altă parte, în aproape toţi citocromii poziţia 5 şi 6 a Fe sînt ocupate de către o grupare specifică a unui rest de amino acid al proteinei, astfel încît acestea nu pot fi legate cu liganzi ca: O_2, CO sau CN.[329]

In hemoglobină şi mioglobină, atomul de Fe nu-şi modifică valenţa în timpul fixării sau pierderii oxigenului, rămînînd ca Fe II. Insă atît hemoglobina cît şi mioglobina pot fi oxidate la Fe III sau forma heminică de către agenţi oxidanţi ca fericianura,cu o schimbare de culoare de la roşu la brun.Produşii astfel formaţi poartă denumirea de methemoglobină şi metmioglobină. Aceştia nu mai funcţionează ca transportori de oxigen.

In citocromi atomul de fier în mod normal este supus schimbărilor între forma Fe II şi Fe III. Funcţia reală a acestora este de a servi ca transportori de electroni,în timp ce hemoglobina şi mioglobina acţionează ca transportori de oxigen sau de liganzi.

După poziţia caracteristică a benzilor de absorbţie în stare redusă citocromii sînt clasificaţi în trei clase principale: a, b, şi c.
Fiecare citocrom în stare redusă are trei benzi de absorbţie diferite în spectrul vizibil α, β şi γ sau Soret.

In pagina următoare este redat spectrul de absorbţie a citocromului c.



Marea majoritate a citocromilor sînt puternic legaţi de membrana mitocondrială şi greu de obţinut în stare solubilă şi în formă omogenă. Excepţie face citocromul c care este uşor extras din mitocondrii în soluţii puternic saline. S-a obţinut citocrom c în formă cristalină de la mai multe specii şi este cunoscută secvenţa în amino acizi a acestuia. Astfel citocromul c din diferite specii de mamifere, la păsări, reptile, peşti conţine 104 resturi de amino acizi.

La nevertebrate, peşti şi plante citocromul c conţine 108 resturi de amino acizi. Diferenţele în secvenţa amino acizilor de la diferite specii este minoră.

Analizînd sinteza diferitelor tipuri de cito-

cromi din diverse țesuturi la șobolani s-au obținut următoarele date:

Citocromul	Animal	Țesut	Timp de înjumătățire	Bibl.
Cit. P_{450}	Șobolan	Ficat	50 ore	330
cit. b_5	"	"	4,9 zile	331
cit. b_5	"	Mitocondrii (ficat)	4,4 zile	332
cit. b	"	"	5,5 zile	333
cit. c	"	"	6,1 zile	333
cit. c	"	Ficat în regenerare	5,4 zile	334
cit. c	"	Rinichi	15,6 zile	335
cit. c	"	Mușchiul scheletic	32 zile	336
cit. c	"	Inimă	43 zile	336

Studiind sinteza citocromului c, Gonzales(337) arată că încorporarea de ^{14}C-lizină în citocromul c se face cu precădere la nivelul reticulum-ului endoplasmatic. Dacă omogenatul de ficat se separă în nuclei, mitocondrii, microzomi și citoplasmă, citocromul c este găsit în toate fracțiunile.(338,339,340)
Gonzales(338) găsește 38% din citocromul c localizat extramitocondrial. Același autor găsește apoi 13% din citocromul c localizat extramitocondrial.(341)

Prezența unor cantități importante de citocrom c în spațiul extramitocondrial, arată că citocro -

mul c poate avea un rol fiziologic important înafara catenei respiratorii mitocondriale. Pînă în prezent, în acest sens datele din literatură sînt foarte sumare.

Timpul de reînoire al citocromului c microsomial este de circa 100 de ori mai mare decît a celui mitocondrial.[342] Se poate presupune că o parte din acest timp este folosit în formarea unui complex protein-fosfolipidic, care ulterior poate fi transformat în mitocondrie.[334]

In literatură sînt descrise 155 tipuri de citocromi, obţinuţi din diferite organisme pentru care se cunosc potenţialele de oxido-reducere.[343]

Citocromii b

Pappenheimer[344] arată că după spectrul de absorbţie se cunosc 8 tipuri de citocromi b şi anume: citocromii b, b_1, b_2, b_3, b_4, b_5,b_6, şi b_7. Citocromul b care este deosebit de răspîndit în ţesutul muscular are un maxim de absorbţie de 564 nm; citocromul b_1 din bacterii la 560 nm; citocromul b_2 din drojdie la 562 nm; citocromul b_3 din plante superioare la 559 nm; citocromul b_4 din bacterii la 554 nm; citocromul b_5 din creierul de mamifere şi păsări la 557 nm; citocromul b_6 din plante verzi la 563 nm etc.

La plante citocromul b_3 şi b_7 transportă electronii direct la oxigen, înlocuind astfel citocromoxidaza. Citocromul b nu reacţionează nici cu cianura nici cu oxidul de carbon; el poate fi redus cu diferiţi reducători ca p-fenilendiamina, acidul ascorbic, sau

cel mai bine prin sistemul succin-dehidrogenazic. Pentru acest motiv, citocromul b a fost considerat ca făcînd parte din structura succin-dehidrogenazei.[345]

Jackson[346] arată că citocromul b participă în toate procesele oxidative mitocondriale.

Studiind biosinteza citocromului b în mitocondrii de Neurospora crassa, Weiss[347] arată că din mitocondriile acestor organisme se poate izola prin cromatografie pe rășină de oleil polimetacrilat o proteină membranară care conține circa 16 µmoli citocrom b pe gram de proteină. Analizînd sinteza citocromului b ajunge la concluzia că acesta conține două lanțuri polipeptidice scurte, de origine citoplasmatică, care poartă hemul grupului b și un lanț lung polipeptidic de origine mitocondrială. Faptul că o parte din structura citocromului b este sintetizată în mitocondrii este relatat și de Mitchell[348] și de Clark.[349] Greutatea moleculară a acestei proteine membranare este de 55000, din care cele două fragmente scurte au greutăți moleculare de 10000 și 11000, iar fragmentul lung are o greutate moleculară de 32000. Gruparea heminică b este legată de fragmentele mici.

Lehninger analizînd unele proprietăți ale citocromilor mitocondriali, găsește pentru citocromul b o greutate moleculară de 30000.

Din tabelul redat în pagina următoare se văd unele proprietăți ale citocromilor mitocondriali.[353]

Citocrom	Greutate moleculară	E_0', volţi	Maxim de absorbţie în forma redusă nm α	β	γ
b	30000	+0,050	563	532	429
c_1	370000	+0,220	554	524	418
c	13000	+0,254	550	521	415
a	240000	+0,28	600		439
a_3			603,5		443

Strittmatter(350) şi Garfinkel(351) descriu în microsomi o componentă citocromică pe care o denumesc citocromul b_5 sau citocromul m care ar participa în oxidarea NADH-ului. Nici acest citocrom nu reacţionează cu cianura şi CO. Rolul biologic al acestuia nu este încă suficient de cunoscut.

Raw şi Mahler(352) găsesc citocromul b_5 împreună cu o reductază corespunzătoare în mitocondrii de ficat.

In timpul oxidărilor mitocondriale mai aproape de substrat dintre toţi citocromii pare să fie citocromul b. La adăugare de antimicină A care inhibă oxidarea succinatului de către oxigen, numai citocromul b rămîne în stare redusă, restul citocromilor fiind oxidaţi. Aceasta arată că la inhibiţia cu antimicina A, citocromul b este situat de partea substratului, iar ceilalţi citocromi de partea oxigenului.

Citocromul c_1, oxidat de sistemul a_3+O_2 numai în prezenţa citocromului c; aceasta demonstrează că faţă de citocromul c_1 este situat de partea substratului. Acest fapt a fost demonstrat şi prin reducerea citocromului c_1 de către succinat în absenţa citocromului c.

Dacă clasificarea citocromilor se face pe baza tipului de hem pe care-l conţin, rezultă că numai patru tipuri de hem pot fi întîlnite în structura citocromilor şi anume:

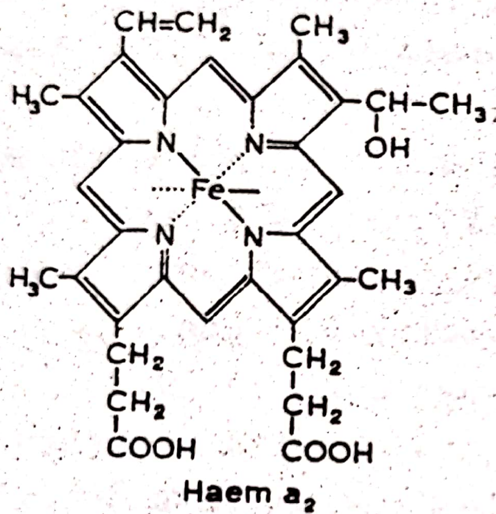
- hem a_2
- hem a
- protohem
- hem c.

Hemul a_2 (hemul verde) cu banda de absorbţie α a hemocromogenului piridinic la 613-620 nm intră în structura citocromului a_2.
Hemul a sau hemul dicroic cu banda de absorbţie α a hemocromogenului piridinic la 585-586 nm intră în structura citocromilor a şi a_1.

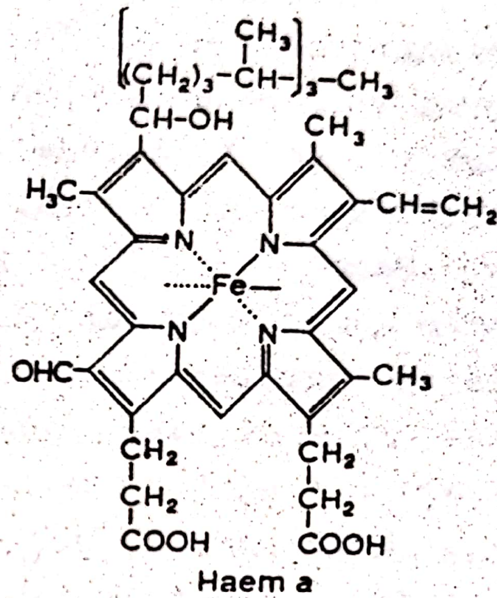
Protohemul sau hemul roşu cu banda de absorbţie α a hemocromogenului piridinic la 557 nm intră în structura citocromilor b, b_1, b_2, b_3, b_5, b_6, b_7 şi h.

Hemul c cu banda de absorbţie α a hemocromogenului piridinic la 550 nm intră în structura citocromilor c, c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, b_4 şi f.

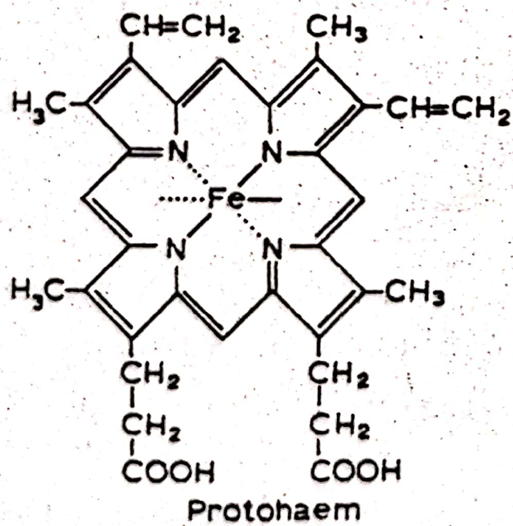
Structura celor patru tipuri de hem este ilustrată în pagina următoare:



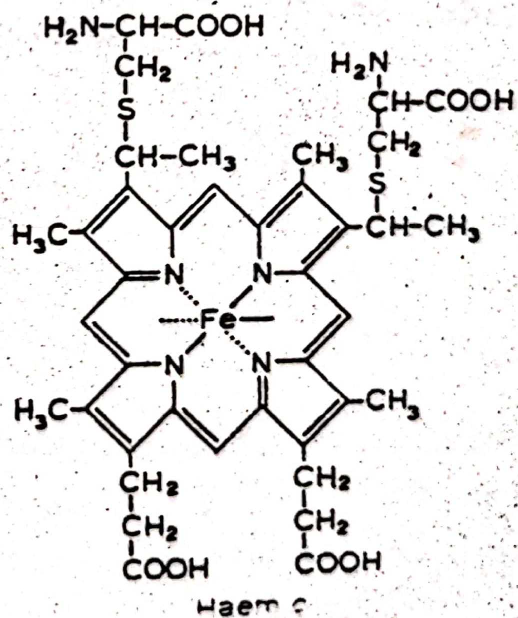
Haem a_2



Haem a



Protohaem



Haem c

După cum se ştie, porţiunea hemică a celor mai multe hemoproteine poate fi separată de porţiunea proteică prin tratare cu acetonă-HCl şi hemul a_2, hemul a şi protohemul pot fi dozate spectrofotometric prin reacţia hemocromogen piridinică.

Hemul din citocromii de tip c nu poate fi separat prin acest tratament întrucît două din catenele laterale ale hemului c sînt legate covalent prin legături tioeterice cu resturi de cisteină ale proteinei. Aceste legături sînt rupte prin tratament cu Ag_2SO_4.

Citocromii a, a_1, şi a_2 au afinitate pentru oxigen şi CO, iar cei de tip c sînt inerţi faţă de oxigen şi CO.

Citocromul c_1

A fost descoperit de Yarushiji şi Okunuki.[354] Aşa cum s-a mai arătat, în structura citocromului c_1 ca parte constituentă găsim hemul de tip c. Ca şi pentru citocromul c_1 s-a demonstrat că ferocitocromul c_1 poate fi uşor oxidat de fericitocromul c şi că porţiunea hem a citocromului c_1 insolubil este aceeaşi ca şi a citocromului c solubil. Cu toate că deşi porţiunea proteinică a primului este acidă, porţiunea proteinică a celuilalt este bazică. S-a demonstrat că ferocitocromul c_1 este un donator natural de electroni, legînd citocromul a de citocromul c.

Preparatele de citocrom c_1 puternic purificat au maxim de absorbţie în formă redusă la 553, 523 şi 418 nm, iar în forma oxidată la 523 , 411 şi 278 nm.

Conţinutul în fier determinat cu ortofenantrolină este de 0,15%.Considerînd că un atom de fier este prezent în fiecare moleculă de citocrom c_1,se poate deduçe pentru citocromul c_1 o greutate moleculară de 36700.
Aşa cum am arătat mai sus Lehninger(353) apreciază pentru citocromul c_1 o greutate moleculară de circa 370000, conţinînd 4 grupări hem pe moleculă.(360) Preparatele de citocrom c_1 nu se cpmbină nici cu cianura şi nici cu CO arătînd că hemul este ascuns în fracţiunea proteică, la fel ca şi în cazul citocromului c.

Intre citocromii c_1 şi c există o serie întreagă de asemănări în ceea ce priveşte spectrele de absorbţie,specia hemului,potenţialul redox,modul de legare dintre hem şi proteină.Totuşi,între aceste două tipuri de citocrom există şi deosebiri structurale şi funcţionale.Astfel,deşi hemul este identic în ambele tipuri de citocromi porţiunea proteică este diferită.
Citocromul c are activitate citocrom oxidazică împreună cu citocromul a,în timp ce citocromul c_1 nu posedă această activitate.S-ar putea ca aceste deosebiri să se datoreze faptului că fracţiunea proteică a citocromului c_1 este acidă şi deci asemănătoare celeia a citocromului a, în timp ce fracţiunea proteinică a citocromului c este o componentă bazică.
Citocromul c_1 este rapid redus de agenţi reducători ca: borohidrida de potasiu,$Na_2S_2O_4$,acidul ascorbic,cisteina, tioglicolatul de sodiu.
Citocromul c_1 redus,în condiţii normale fiziologice,este foarte puţin autooxidabil,este puţin oxidat de către

fericitocromul a și puternic oxidat la adăugarea de cantități infime de citocrom c. Aceste date arată [354, 355,356,357,358] că transferul de electroni se face cu rapiditate mare între citocromii c_1 și c și foarte încet între citocromii c_1 și a. Deci citocromul c_1 este un donator de electroni natural pentru sistemul citocrom-oxidazic constituit din citocromi a și c. Citocromul c_1 este redus enzimatic fie de către sistemul succinat oxidazic, fie de către un sistem NADH-oxidazic, ambele sensibile la antimicina A.

Citocromul c_1 a fost puternic purificat din mitocondrii de mușchi de inimă de șobolan[354] și de porc [359]. In contrast cu citocromul c, citocromul c_1 este foarte termolabil, o inactivare totală obținîndu-se după 5 minute la 50°C.

Fragmentînd lanțul respirator și reconstituindu-l din componentele care îl formează, King[361] descrie clivarea succinat oxidazei în două părți:

-citocrom c reductaza

-citocrom oxidaza

Mai tîrziu,[362] s-a obținut separarea succinat citocrom c reductazei în succinat dehidrogenază și un segment b - c_1. Cu aceste două fragmente se reușește reconstituirea sistemului activ succinat citocrom c reductazic.[363]

Recent, s-a descris o metodă de izolare a citocromului c_1 din inimă de bovine, pornindu-se de la sistemul succinat citocrom c reductazic.[364]

Preparatul de citocrom c_1 conține 25 nmoli/mg

proteină. Metoda se deosebește de cele precedente prin faptul că folosește o extracție cu β-mercaptoetanol și o fracționare anaerobă cu sulfat de amoniu. Preparatul obținut prin această metodă are un spectru de absorbție pentru citocromul c_1 redus cu maximum la 552,5; 530; 522,5 512; 417; 317; 276 nm, și pentru citocromul c_1 oxidat: 558; 522; 411; 355; 276 nm.

Oxidul de carbon și oxigenul nu afectează aceste spectre. Preparatul de citocrom c_1 conține hidrați de carbon circa 2%, flavine extrase în mediu acid circa 0,67 nmoli/mg proteină,[364] fier neheminic circa 0,2 nmoli/mg proteină și fier heminic 25,4 nmoli/mg proteină.

Deși spectrul de absorbție pentru citocromul c_1 este asemănător cu acela al citocromului c, în spectrul vizibil la temperatura camerei și în azot lichid (-160°C) în spectrul de infraroșu, spectrele de absorbție ale citocromilor c_1 și c reduși sînt diferite, ceea ce arată conformații moleculare diferite pentru cele două tipuri de citocromi. Spectrele de dicroism circular au confirmat această deducție.[365]

Citocromul c_1 poate fi folosit ca donator sau acceptor de electroni în legătură cu sistemul de transfer de electroni din particulele submitocondriale din inimă de bovine.

<u>Citocromul c</u>

Citocromul c este o hemoproteină care conține o grupare prostetică legată covalent. Nucleul de porfirină este legat de componenta proteinică prin două punți

tioeterice între catenele laterale vinilice reduse și resturile de cisteină.[366,367]

Flatmark[368] arată că citocromul c izolat din mușchiul de inimă de bovine, poate exista în mai multe forme moleculare. Astfel prin separări prin metoda disc electroforeză în gel de poliacrilamidă s-au separat 4 subfracțiuni ale citocromului c, descrise ca: Cy I, Cy II, Cy III, Cy IV. Raportul între fracțiunile Cy I - Cy III, a fost de aproximativ 90:9:1 măsurat după absorbția la 416 nm. Un grad asemănător de heterogeneitate a fost obținut și prin cromatografie[369] pe Duolite CS-101 și prin fracționare izoelectrică prin electroliză în gradient natural de pH.[368] Datele experimentale obținute arată că aceste fracțiuni există și <u>în vivo</u> .

Intrucît studii efectuate cu ^{59}Fe la șobolani arată schimbări în activitatea specifică a ferului în diferite subfracțiuni ale citocromului c este de presupus posibilitatea conversiei Cy I în alte fracțiuni <u>în vivo</u>.[368]

Deoarece toate formele de citocromi c pot fi izolate dintr-un singur organ s-a propus folosirea de <u>izocitocrom</u>[369] în analogie cu termenul de <u>izoenzime</u>[370] folosit în denumirea multiplelor forme moleculare ale enzimelor.

Izocitocromii au o serie de particularități fizico-chimice care îi fac să nu fie echivalenți din punct de vedere fiziologic.
Din următorul tabel se văd o serie de proprietăți ale izocitocromilor Cy I - Cy III.[368]

	Cy I	Cy II	Cy III
Distribuţia la %	90	9	1
Viteza de migrare electroforetică la 0°C	10,80	10,60	10,32
Fracţionare izoelectrică(P_a)	10,80	10,58	10,38
Compoziţia în amino acizi	[nici o diferenţă]		
Azot amidic/moleculă	8,40	7,51	-
Potenţial redox (volţi)	0,247	0,212	0,187
Autooxidabilitate (pH 7)	Cy	Cy II	Cy III
Legarea de CO (pH 7)	0	0	0

Prin cromatografie pe Amberlite I.R.P.64 din citocromul c din Saccharomyces cerevisiae, s-au separat doi izocitocromi c a căror compoziţie în amino acizi este foarte asemănătoare.[382] La aceste celule s-a putut identifica cu ajutorul unui sequenator automatic de amino acizi, o eroare în secvenţa izocitocromului I în sensul, că resturile 15 şi 16 sînt leucină-glicină şi nu glutamină-leucină.

S-a demonstrat apoi că în secvenţa a 35 specii cunoscute de citocromi c mitocondriali, restul 16 este glutamină, în afară de două cazuri de Neurospora crassa şi de Candida krusei, la care s-a considerat că restul

16 este completat cu acid glutamic.(383,384,385)
Tot cu ajutorul unui sequenator automatic de proteine, s-a putut demonstra că restul 16 din citocromul c de la Candida krusei, este glutamină şi nu acid glutamic.
In acest fel, numai citocromul c de la Neurospora crassa rămîne acum cu restul de acid glutamic. Deci cu această excepţie, restul 16 din lanţul polipeptidic al citocromului c poate fi considerat ca un rest invariabil.

Optimum de absorbţie pentru citocromul c în stare cristalină obţinut din drojdie de bere, sub formă oxidată este la 530,410,358,275 nm, iar pentru forma redusă, la 550,520,415,316,275 nm.
Greutatea moleculară a citocromului c din muşchi de inimă de om este de 12750,(371,372) iar din muşchi de inimă de bovine de 12400.(373)

Studiind compoziţia în amino acizi a citocromului c izolat din inimă de om, **Matsubara**(374) găseşte în procente următoarea structură:

- ac.aspartic şi asparagină	7,69 %
- treonină	6,73 "
- serină	1,92 "
- glutamat şi glutamină	9,62 "
- prolină şi hidroxiprolină	3,85 "
- glicină	12,5 "
- alanină	5,77 "
- cisteină	1,92 "
- valină	2,88 "
- metionină	2,88 "

- izoleucină	7,69 %
- leucină	5,67 "
- tirozină	4,81 "
- fenilalanină	2,88 "
- triptofan	0,96 "
- lizină	17,31 "
- histidină	2,88 "
- arginină	1,92 "

Intr-un studiu făcut supra secvenţei amino acizilor din citocromul c de la 25 de specii acoperind întreaga scală filogenetică s-a găsit următorul fragment polipeptidic de la restul 70 la restul 80 :

Asn-Pro-Lis-Lis-Tir-Ile-Pro-Gli-Thr-Lis-Met
70 80

Aceasta demonstrează că acest fragment în timpul procesului evoluţionar a rămas neschimbat şi există foarte puţine exemple de acest fel în natură. Acest fragment pare să aibă un rol deosebit în specificitatea de activitate a citocromului c şi care este strîns legat de hem şi în mod deosebit,un rol esenţial pare să-l aibă restul de metionină 80 din structura sa.

De asemeni constant în toate speciile de citocrom c studiate, este restul de triptofan din poziţia 59 şi resturile de arginină din poziţiile 38 şi 91.

Studiind secvenţa amino acizilor din citocromul c la peşti[411] (Cyprinus carpio,Squalus sucklii, Cyprinus carpio haemotopterus), s-a constatat că spre

deosebire de alte vertebrate, la pești, comun este restul de asparagină 22 și restul de serină 54.

La un număr important de specii, hemul este legat de structura polipeptidică prin resturile de cisteină 14 și 17 care rămîn constante față de resturile de amino acizi din imediata apropiere, care variază foarte mult.

Concluzii definitive cu privire la legătura dintre secvența amino acizilor din structura citocromului c de la diferite specii și funcția acestora este greu de stabilit.

Folosind un citocrom c modificat chimic, s-a observat că funcția acestuia ca transportor de electroni, se pierde prin acilarea resturilor de lizină.[375]

Este de asemeni precizat rolul esențial a 4 resturi de lizină care pot fi trinitrofenilate și a restului de metionină din poziția 80 pentru funcția biologică a citocromului c.[376,377]

Se cunoaște faptul că citocromul c în formă redusă are o afinitate mai mică față de rășina cationică de Amberlit-CG-50, decît forma oxidată a acestuia. De aici se vede că o simplă modificare a valenței Fe din molecula de hem[378,379,380,381] induce modificări esențiale în conformația moleculei citocromului c.

Modificarea din conformația citocromului c prin oxidare sau reducere, poate fi atribuită creșterii sau descreșterii numărului de grupări încărcate pozitiv și schimbării în solubilitate. Astfel se știe că forma

redusă a citocromului c este mai puțin solubilă în apă decît forma oxidată.

Se știe de asemeni că ferocitocromul c nu are nici un rest de lizină sau guanidină liber, care s-ar putea lega cu tripsina sau cu altă proteinază bacteriană și că ferocitocromul c nu poate fi atacat de tripsină decît în forma oxidată.

Cu toate că oxidoreducerea este funcția principală a citocromului c și cu toate că un număr considerabil de lucrări s-au ocupat cu aspectele acestei reacții, totuși tabloul acestui proces este încă incomplet.

O serie de autori au arătat că optimum de absorbție de la 695 nm a fericitocromului c este un indicator sensibil al modificărilor în conformația acestuia. (387,388,389) S-a demonstrat că absorbția la 695 nm se datorește interacțiunii dintre grupul heminic și un rest de metionină.(389,390)

Intre absorbția la 695 nm a fericitocromului c și capacitatea acestuia de a fi redus, există o strînsă legătură.(389,391,392) Faptul că absorbția la 695 nm este dată de legătura hem-metionină, este demonstrat prin aceea că dacă această legătură este ruptă prin carboximetilare, produsul își pierde absorbția la 695 nm și devine incapabil să reducă acidul ascorbic.(392,393)

Pentru citocromul c din inimă de cal, s-a calculat un potențial redox standard de +261 ± 1mV la 25° I = 0,001 la pH neutru.(394,395,396)

Valoarea potențialului standard redox, deci schimbul de

energie liberă a reacției redox,este rezultatul influenței tuturor componenetelor, proteină și porfirină asupra ionilor ferici sau feroși. Acest schimb de energie liberă reprezintă echilibrul dintre schimbările entalpiei și entropiei reacției redox.[395]

Pe baza unor studii termodinamice a oxidoreducerii citocromului c s-a ajuns la concluzia că în soluție apoasă citocromul c este supus după reducere, unei modificări conformaționale delicate,care condiționează reducerea suprafeței moleculei de citocrom c și separarea moleculelor de apă legate de aceasta. Acestea din urmă, folosesc volumul liber obținut de către proteina care se contractă, pentru a forma punți de hidrogen cu apa. Stabilizarea formei reduse în mediul apos este datorită mai mult efectelor de solvatare și mai puțin efectelor legate de conformația proteinică.
Atomul de Fe se leagă în planul ciclului porfirinic cu cea de-a 5-a legătură coordinativă de un atom de azot al ciclului imidazolic al restului 18 de histidină, și prin a 6-a legătură coordinativă de atomul de S al restului 80 de metionină.Liganzi[397,398,399] care leagă fierul ca : azida, cianura și imidazolul, pot coordina cu Fe și datele obținute pînă acum arată că acești liganzi se leagă prin îndepărtarea metioninei 80.
Viteza de deslocuire a sulfului metioninei 80 din locul său de coordinare, controlează viteza de reducere a fericitocromului c.[400]

Harbury[401] în studiile sale asupra citocro-

mului c din Pseudomonas observă că acesta conţine numai un singur rest histidinic iar restul de metionină este legat de hem, în acelaş mod în care a fost descrisă legătura dintre restul de histidină 18 şi metionină 80 de hemul din citocromul c de la mamifere.

Proprietăţile de donator de electroni a citocromului c au fost examinate în soluţie printr-un număr însemnat de metode. Se pare că cele mai simple determinări au fost făcute folosind citocromul c în calitate de oxidant sau reductant propriu, modificările fiind determinate prin spectrele de rezonanţă nucleară magnetică.[402] Constanta de viteză[403] a reacţiei de ordinul II este destul de mică şi anume: 10^4 $M^{-1}sec.^{-1}$ O constantă de viteză mult mai mare a fost computerizată din datele cinetice şi din proprietăţile de echilibru staţionar a lanţului respiratpr (de circa 10^7 $M^{-1}sec^{-1}$). Aceeaşi constantă de viteză s-a obţinut şi folosindu-se citocrom oxidază purificată ca oxidant.[404,405]

Capacitatea extraordinară de donator de electroni a citocromului c este vizibilă în reacţia cu sistemul peroxidază-peroxid descris de Keilin[405] în 1937. Reacţia ferocitocromului c cu complexul enzimă-substrat al citocrom c peroxidazei din drojdie este cea mai rapidă interacţiune proteină-proteină măsurată în soluţie.

Timpul de înjumătăţire al oxidării citocromului c de către sistemul peroxidazic, este de 70 μsec. Acesta este un timp foarte scurt dacă ne gîndim la faptul că este computerizat pentru o activitate enzimatică

care include timpul pentru molecula de citocrom c de a difuza la suprafaţa intermediarului enzimă-substrat,de a dona electronul său intermediarului peroxidic şi de a difuza din loc pentru a permite moleculei următoare, apropierea.In determinarea acestui timp de reînoire sînt implicaţi doi factori şi anume: timpul real de difuzie şi timpul real de transfer de electroni.Ultimul trebuie să fie mult mai mic de 70 sec.[406]

Chance[406] arată că în mitocondriile de la animale electronii sînt transferaţi de la citocromul c la citocromul a,reacţia fiind sensibilă la căldură. Transferul de electroni de la citocromul c la citocromul a este mult mai slab în comparaţie cu viteza de transfer din reacţia citocromului c cu peroxidaza sau peroxidul.

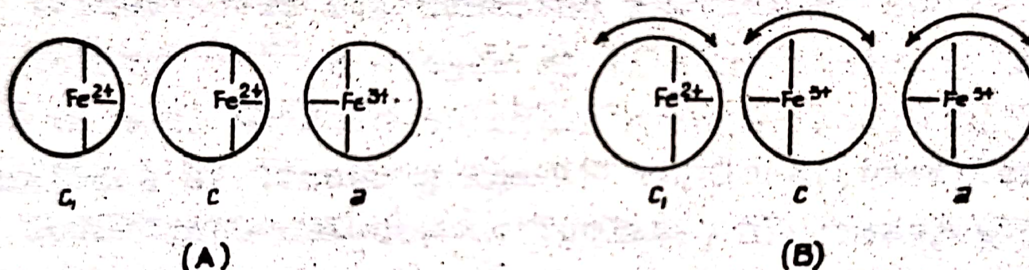
Observînd scăderea activităţii catalitice a sistemului transportor de electroni care rezultă de pe urma distrucţiei celulare, se presupune că eficienţa acestui sistem în celula vie se datoreşte unor condiţii optime de accesibilitate mutuală a componentelor catalitice.[407,408] Această ipoteză a lui Keilin, este astăzi dezvoltată în sensul că mitocondriile celulei integre pot constitui oprelişti, stăvilare în calea unei accesibilităţi mutuale, sub forma unui mecanism de control.[406]

O a doua posibilitate de control a accesibilităţii mutuale a transportorilor de electroni, presupune că transferul de electroni implică nu numai mişca-

rea hemului citocromului c faţă de un punct fix din moleculă aşa cum se vede din schema(A)de mai jos, dar şi o juxtapunere a porţiunilor heminice a citocromilor a şi c care reduc simţitor probabilitatea unei reacţii dintre aceştia, aşa cum se vede din schema(B).

Transfer de electroni

Transport de electroni prin activare termică



Reprezentarea schematică a diagramei indicînd două tipuri de transfer de electroni între citocromi.
Schema (A) reprezintă citocromii c şi a în orientare proximală permiţînd transferul de electroni imediat.
Schema (B) indică porţiunile hem ale citocromului c şi a în orientare distală care implică necesitatea unei rotaţii pentru ca transferul de electroni să se poată desfăşura.(406)

In momentul adăugării oxigenului la transportorii reduşi din lanţul respirator de la mamifere, unele porţiuni heminice vor fi găsite într-o orientare proximală astfel încît transferul de electroni între citocromul c şi a va avea loc deosebit de rapid (schema [A]). Este posibilă însă şi o orientare în care o rotaţie de 180° sau o translaţie echivalentă sînt necesare pentru a aduce hemul citocromului purtător de electron şi acceptorul acestuia, într-un contact adecvat strîns [schema (B)].

S-a determinat concentraţia citocromului c în diferite ţesuturi animale şi vegetale.(409) Astfel, conţinutul în citocrom c în inima de broască este de 2,6 mg% g ţesut umed, la bovine 21 mg% g ţesut, la şobolani 53 mg % g ţesut; în plămînul de şobolan conţinutul în citocrom c este de 2-3 mg % g ţesut.

Vernon(410) arată că în celulele microorganismului Rhodospirillum rubrum, concentraţia citocromului c este de trei ori mai mare decît în celulele ficatului.

Citocromul a, citocromul a_3, citocrom oxidaza

In lanţul respirator mitocondrial, la mamifere etapa finală este catalizată de aşa numitul sistem citocrom oxidazic sau citocrom c oxidazic. Denumirea se bazează pe activitatea sistemului care este capabil pe de o parte să oxideze citocromul c redus, iar pe de altă parte să reducă oxigenul la apă. In condiţii nor-

male, energia liberă obţinută din oxidarea catalizată de citocrom oxidază poate fi conservată sub forma de legături macroergice pirofosforice în structura ATP.

Otto Warburg [412] defineşte componenta celulară care reacţionează cu oxigenul drept hemoproteină.

Citocrom oxidaza descrisă uneori şi sub denumirea de citocromul a, este o componentă formată din doi citocromi şi anume citocromul a şi citocromul a_3. Citocromul a_3 reacţionează cu CO, cianura şi azida şi este autooxidabil. Citocromul a nu reacţionează cu aceşti inhibitori şi nu este autooxidabil.

In structura citocromoxidazei intră deci, citocromul a şi a_3, componente care pot fi distinse chimic şi spectral, şi ioni de cupru care pot reacţiona în calitate de componentă redox, dar problema modului exact în care aceştia intervin în aceste procese rămîne încă deschisă.

Sistemul citocrom oxidazic poate fi considerat ca unul dintre cele mai importante sisteme enzimatice, responsabil direct de folosirea volumului mare de oxigen (probabil mai mult de 90% consumat în timpul proceselor de viaţă, pe planeta noastră. Incă în 1896 Bertrand [413] remarcă în plante prezenţa unor enzime capabile să catalizeze reducerea oxigenului molecular şi pe care le numeşte oxidaze, a căror structură o postulează a fi metalo proteinică.

In 1924 Warburg[414,415] arată că în celulă oxigenul este activat de către o enzimă care conţine

fer şi pe care o numeşte enzima respiratorie sau " Atmungs Ferment ". El arată că în enzima respiratorie, componenta cu fer este redusă de către metaboliţi la starea ferоasă şi este oxidată de către oxigen la starea ferică. De asemeni arată că atomul de fer transportor de oxigen, este locul de inhibiţie a respiraţiei cu cianură. In 1926 tot Warburg[416] demonstrează că inhibiţia cu CO a respiraţiei celulare este reversibilă la lumină, aceasta fiind o dovadă că enzima respiratorie este un compus heminic.

In 1939 Keilin şi Hartree[417,418] studiind spectrele de absorbţie ale citocrom oxidazei, ajung la concluzia că citocromul a_3 este o componentă distinctă de citocromul a şi că citocromul a_3 este de fapt enzima respiratorie a lui Warburg sau citocrom oxidaza.

In afară de reactivitatea cu cianura şi CO, au putut fi stabilite şi alte diferenţe între citocromul a şi a_3. Astfel, Chance[404] arată că în timpul oxidării succinatului în muşchiul de inimă, reducerea cantitativă a citocromului a_3 (calculată din absorbţia la 445 nm) diferă de aceea a citocromului a (calculată din absorbţia la 605 nm).

Smith[419] demonstrează că în echilibru într-un sistem care constă din acid ascorbic, citocrom c, citocrom a, citocrom a_3 şi oxigen, citocromul a este redus în proporţie de 59%, în timp ce citocromul a_3 este redus numai 24% .

Dacă mitocondriile sau celulele întregi sînt

incubate in atmosferă de oxigen în prezență de substrat, citocromul a_3 este oxidat mai rapid decît citocromul a.[420] Citocrom oxidaza la concentrații de O_2 mai mari de 10 µmoli arată de asemeni o oxidare mai mare a citocromului a_3. La concentrații de O_2 mai mici de 5 µmoli citocromul a este oxidat mai rapid decît citocromul a_3.[421] In prezență de agenți tensioactivi, reducerea citocromului a și a_3 este mult diferită.[422] Borohidrida care reduce restul carboxilic al hemului a într-o grupare alcoolică afectează numai hemul care se combină cu CO, deci citocromul a_3, fiind fără nici un fel de efect asupra citocromului a, dacă borohidrida se adaugă la un preparat de citocrom oxidază în prezența cianurii.

Gibson[421] observă că CO legat de citocrom oxidază reprezintă numai o treime față de conținutul în hem al enzimei. Poțiunea heminică din citocromul a și din citocromul a_3 pare să fie identică.[417,423,424]

Proteinele native ale citocromului a și a_3 diferă într-o astfel de măsură încît cu aceeași componentă heminică formează doi compuși cu proprietăți distincte.

Indiferent dacă citocromul a și a_3 reprezintă sau nu două proteine independente, aceste componente trebuie privite ca două entități independente din punct de vedere funcțional.

In structura citocrom oxidazei găsim două grupări heminice diferit legate de proteină și cupru

puternic legat de structură, care nu poate fi separat prin dializă față de cianură. Raportul cupru:fer ajunge la 1 după dializa enzimei față de cianură sau după tratare cu sephadex conținînd un agent chelator pentru cupru[425].

Citocromul c redus este considerat partener de reacție al citocrom oxidazei. Smith și Conrad[426] demonstrează că citocromul c este un inhibitor efectiv al citocrom oxidazei și că, capacitatea diferitelor tipuri de preparate de citocrom oxidază de a reacționa cu citocromul c este influențată de compoziția mediului. Estabrook[427] găsește că activitatea preparatelor de citocrom oxidază de mușchi de inimă, față de citocromul exogen, este afectată de concentrația tamponului fosfat și remarcă o scădere a K_m enzimei de ordinul sutelor la concentrații mici de fosfat. La concentrații de hem a, de $5x10^{-6}$M și de citocrom c de $1x10^{-5}$M reacția este completă în mai puțin de 10 milisec. după inițiere prin amestec. In această reacție numai citocromul a este redus.

Oxidul de carbon se combină numai cu citocromul a_3 (Fe II) formînd un complex fotosensibil. Apariția fotosensibilității poate fi folosită ca un test în măsurarea formării de citocromi a_3 redus, demonstrînd că viteza de combinare a CO cu citocromul a_3 (Fe II) este rapidă în comparație cu viteza generării acestuia în reacția de reducere.[428]

Date experimentale arată că citocromul a (Fe^{3+}) este redus rapid de către citocromul c (Fe^{2+}) în schimb

citocromul $a_3(Fe^{3+})$ nu este redus de citocromul c.

Yonetani[429] în 1960 folosind un preparat înalt purificat de citocrom oxidază de origine animală demonstrează separarea spectrofotometrică a citocromului a și a_3.

Beechey[430] demonstrează prezența citocromului a și a_3 în mitocondriile fosforilante de crab. S-a demonstrat că citocromul a, citocromul a_3 și citocrom oxidaza sînt similare la crustacee și mamifere.

Lemberg[431] demonstrează că citocrom oxidaza izolată din inimă de bovine cu detergenți ionici(cholat) conține două entități spectroscopie distincte și anume citocromul a și citocromul a_3. Totuși rămîne încă neclar dacă această distincție spetroscopică este cauzată de prezența a două hemoproteine distincte sau de către aceeași hemoproteină prezentă în două condiții de mediu diferite. Este de asemenea neclar dacă hemul a este asociat cu un polipeptid sau cu două polipeptide.

Shakespeare și Mahler[432] purificînd citocrom oxidaza din drojdie, demonstrează prezența unei singure componente heminice, observație confirmată și de Stotz[433] pentru enzima de bovine. Pentru enzima din inimă de bovine Okumuki[435] găsește o greutate moleculară de 530.000. Greutatea moleculară pentru fragmentele monomere a fost găsită în jur de 100.000 ceea ce arată posibilitatea unei structuri pentamerice pentru citocrom oxidază.

Love[433] izolînd citocrom oxidaza, de asemeni din inimă de bovină în 0,1% emasol(detergent neionic)

găseşte o greutate moleculară de 200.000 şi observă că enzima disociază în doi monomeri cu o greutate moleculară în jur de 100.000 la p_H alcalin. Diferenţele de solvent pot explica discrepanţele în ceea ce priveşte aprecierea greutăţii moleculare.

Chan[434] studiind proprietăţile spetroscopice şi enzimatice ale formei monomerice ale citocrom c-xidazei în comparaţie cu forma dimerică a enzimei, observă că forma monomerică (greutate moleculară 100.000) reţine 83-97% din activitatea catalitică a dimerului. Expunerea citocrom oxidazei la p_H alcalin între 9,5 şi 11 nu duce la denaturarea enzimei. Activitatea enzimatică a formei monomere şi dimere a citocrom oxidazei măsurată după viteza de oxidare a formei feroase a citocromului c este relativ egală. Această constatare poate fi interpretată în diferite moduri.

O posibilitate constă în aceea că în molecula dimerului transferul unui electron de la citocrom c la citocrom a sau a_3 nu este supusă restricţiilor sterice aşa cum s-a observat în cazul reacţiei cu CO, şi că deci nu există nici-o deosebire între citocromul a şi a_3 în ceea ce priveşte transferul de electroni de la citocromul c.

O a doua posibilitate de interpretare constă în aceea că dimerul este considerat ca fiind compus din două porţiuni şi anume dintr-un monomer activ din punct de vedere catalitic şi dintr-un monomer inactiv. De aceea după disociere nu se observă nici o creştere în activitatea enzimatică. In condiţii alcaline este posibil ca

jumătate din moleculă să fie denaturată.

Deși în mediul alcalin asistăm la o disociere a dimerului activitatea enzimatică rămîne aproape integrală(pH=11 ,tampon emasol-fosfat).Dacă citocrom oxidaza este păstrată la +4°C, aceasta își pierde o bună parte din activitate datorită unei agregări crescute.[433,438]

După depolimerizare,formele monomere nu se asociază în structură dimerică la pH 7 în absența citocromului c. Studiind reasocierea monomerilor în dimeri în prezența citocromului c, s-a observat că în primele 40 minute nu poate fi vorba de un astfel de proces.După 120 minute se observă însă o formare considerabilă de dimeri accelerată de prezența unei concentrații de citocrom c echimolară.

Intrucît forma monomerică a citocrom oxidazei este biologic activă,reasocierea monomerilor în dimeri nu poate fi făcută responsabilă pentru activitatea observată. Dintre cei doi monomeri,unul pare a fi asociat cu activitatea enzimatică,iar cel de al doilea pare să fie implicat în legarea enzimei la membrana mitocondrială internă.

Citocrom oxidaza din drojdia de bere[432] pare a fi un complex tetrameric în care structurile monomerice au de asemenea greutatea moleculară în jur de 100000. Enzima din aceste celule pare să fie un complex hemoproteinic care să dețină proprietățile atribuite în mod obișnuit,atît citocromul a cît și citocromul a_3.

Mason[439] solubilizînd citocrom oxidaza din particulele submitocondriale de drojdie de bere, cu cholat(3 mg/mg proteină concentrație finală) după fracționare cu sulfat de amoniu și cromatografie pe coloană de DEAE-celuloză în prezență de 1% Triton X100, constată că enzima conține circa 10 nmoli hem a/mg proteină și că este liberă de orice alte hemoproteine. Greutatea moleculară a enzimei este 190000-225000. Electroforeza în poliacrilamidă în prezență de dodecilsulfat de sodiu (0,03%) împarte enzima în șase benzi polipeptidice majore cu greutăți moleculare de 42000, 34000, 23000, 14000, 12500, și 9500. Toate cele șase componente sînt fizic asociate cu citocrom c oxidaza chiar și după solubilizarea membranei mitocondriale interne.

Pierderea gradată a activității citocrom oxidazei din mitocondrii de inimă de bovine în timpul izolării în prezența cholatului și regenerarea parțială a activității după adăugarea de emasol, au dus la concluzia că probabil lipide guvernează conformația optimă a moleculei de enzimă, pentru funcția biologică, și că emasolul reprezintă un detergent aditiv, funcțional similar pentru moleculă.[440,441,442] Datele obținute de Myer[440] arată că conformația grupării prostetice în starea oxidată a Fe heminic, nu este afectată de natura detergentului. Scăderea activității enzimei în timpul izolării în prezența cholatului și reactivarea[442] cu emasol este atribuită modificărilor în conformație, în special a enzimei reduse de către detergenți sau prin învechire.

Conformaţia grupărilor prostetice este dependentă de natura detergentului folosit în procesul de preparare, de vechimea preparatului şi de starea de valenţă a hemului a.

Detergentul ionic -acidul dezoxicholic- şi învechirea duc la modificări în conformaţia hemului a, în special în stare redusă a Fe, în timp ce oxidaza oxidată este insensibilă la aceşti factori.

S-a demonstrat că oxidaza acoperă două grupări hem a,funcţional distincte dar structural identice. Absenţa interacţiunii[440] hem-hem în moleculă,arată că cele două grupări prostetice sînt separate una de cealaltă cu o distanţă de cel puţin 10-15 Å. Această concluzie este în acord cu cele două păreri cu privire la constituţia enzimei şi anume:

- oxidaza este un exemplu de sistem alosteric.

(443,444) - oxidaza este un sistem cu două componente (citocromul a şi citocromul a_3).

Citocrom oxidaza pare să conţină două componente independente şi conformaţional distincte.[440,445]

Ephrussi şi Slonimski[271] studiind sinteza citocrom oxidazei în mutante de drojdie, arată că deficitul respirator de la aceste celule se datoreşte unei alterări ireversibile şi ereditare citoplasmatice a structurii şi funcţiei mitocondriilor care cauzează pierderea activităţii citocrom oxidazei şi în acelaş timp pierderea cantităţilor detectabile spectroscopic de citocrom a - a_3. Ca urmare se consideră că sinteza

citocrom oxidazei este sub controlul unor determinanţi necromozomiali şi că aceşti determinanţi pot fi găsiţi în mitocondriile ca atare. Observaţii similare au fost făcute şi pe celule de drojdie crescute şi în prezenţa cloramfenicolului care se ştie că inhibă sinteza de proteine mitocondriale.(447)

Sebald(448) arată că cloramfenicolul la concentraţii de 4 mg/ml inhibă cu 90-95% încorporarea de amino acizi în toate polipeptidele preparate din citocrom oxidază, în timp ce marcarea proteinelor membranare ca atare este inhibată numai cu 30%.

Inhibiţia cu cloramfenicol a sintezei de citocrom oxidază simulează fenotipul găsit în "petite" mutantele de drojdie(449) şi mi-l mutanta din Neurospora crassa.(450) De aici s-a tras concluzia că cloramfenicolul inhibă sinteza citocrom oxidazei, prin inhibarea sintezei mitocondriale de proteine. Totuşi rămîne încă neclarificată problema modului în care sinteza de proteine mitocondrială îşi exercită controlul ei asupra formării enzimei legate de membrană.

Weiss(451) arată că amino acizii radioactivi sînt incorporaţi într-un polipeptid dintr-un preparat de citocrom oxidază de către un sistem mitocondrial implicat în sinteza de proteine. Aceasta pare să demonstreze, că sinteza de proteine mitocondrială controlează formarea citocrom oxidazei, contribuind cu o componentă esenţială la structura complexă a enzimei. In prezenţa cloramfenicolului, acumularea de fragmente polipeptidice

de origine extramitocondrială este nealterată. După spălarea preparatului şi îndepărtarea inhibitorului, citocrom oxidaza devine din nou marcată chiar şi în prezenţa unor cantităţi reduse de amino acizi pre - cursori. Aceasta demonstrează clar, că în prezenţa cloramfenicolului, cel puţin o parte din polipeptidele de origine extramitocondrială sînt sintetizate,dar nu integrate în citocrom oxidaza funcţională. Acest efect al cloramfenicolului pare să indice inhibiţia sintezei unei proteine active catalitice implicate în sinteza hemului, sau în altă reacţie necesară pentru asamblarea citocrom oxidazei. S-au descris acumulări de proteine mitocondriale în faza citoplasmatică a celulei.Astfel ATP-aza mitocondrială a fost găsită în citoplasmă dacă celulele de drojdie au fost incubate cu cloramfenicol în timpul derepresiei cu glucoză.[452]

Urmărindu-se sinteza polipeptidelor din structura citocromului a a_3 cu greutate moleculară de 18000, 17000, 13000, 11000 şi 8000, s-a observat că numai primul devine marcat în prezenţa cicloheximidei, şi că celelalte patru, încorporează radioactivitatea în prezenţa cloramfenicolului.[448,451]

Citocrom oxidaza, aşa cum arată datele din literatură conţine 10 μmoli hem a/g proteină.Locul de sinteză a polipeptidelor cu greutate moleculară de 36000 şi 18000 este neclar. Inhibiţia încorporării de ^{14}C din amino acizi indică originea mitocondrială a acestora.Dar marcarea acestora în prezenţa ciclo-

heximidei a fost de asemeni observată deşi nu în aceeaşi măsură ca în cazul polipeptidului cu greutate moleculară de 18000.Dacă aceste polipeptide sînt sintetizate de ribozomii extramitocondriali, inhibiţia marcării în prezenţa cloramfenicolului ar putea fi datorită faptului că sinteza acestora, poate fi represată de un proces reglatoriu dezvoltat după inhibiţia sintezei de proteină mitocondrială.

O altă explicaţie ar fi aceea că polipeptidele indicate pot fi sintetizate în prezenţa cloramfenicolului, dar că acumularea lor nu poate fi folosită în asamblarea citocrom oxidazei.

Tuppy[453] arată că etapa finală din biosinteza hemului a, gruparea prostetică a citocrom oxidazei, sau transferul acesteia de la locul de sinteză la locul de acţiune, este reglată de mitocondrie.

Reconstrucţia citocrom oxidazei folosind particule submitocondriale dintr-o mutantă nerespiratorie "petite" de drojdie ca sursă de apoproteină indică precis că tipul respirator şi mutanta nerespiratorie de mitocondrie de drojdie conţin aceeaşi apoproteină, şi că lipsa citocrom oxidazei active din mutanta "petite" de drojdie, se datoreşte numai indisponibilităţii citoheminei, sinteza căreia este blocată în mutantă.[453]

Conţinutul în Cu şi Fe al mitocondriilor respiratorii al mutantelor "petite" nerespiratorii de drojdie este asemănător.

Imunochimic şi electroforetic nu s-au consta-

tat deosebiri între citocrom oxidaza din mitocondriile respiratorii şi nerespiratorii.Aceste date, arată că în mitocondriile cu respiraţie deficitară a mutantelor de drojdie, poate fi pusă în evidenţă o proteină ce conţine Cu care din punct de vedere electroforetic şi a unor proprietăţi cromatografice este asemănătoare apoproteinei citocrom oxidazei.Aceasta arată că "petite" mutaţia nu afectează întreaga moleculă de citocrom oxidază, ci numai gruparea prostetică a acesteia, şi că este posibilă reconstituirea activităţii citocrom oxidazice încorporînd citohemină în enzima deficitară.(453)

Integrarea componentei heminice în citocrom oxidază pare să fie codificată de ADN mitocondrial(455, 456)

Kuzela(456) în 1969 arată că sinteza porţiunii proteinice a citocromului aa_3 este codificată de către gene nucleare, dar că inserţia acestuia în membrana mitocondrială este efectuată de către un factor de origine mitocondrială.

Codificarea de către ADN-mitocondrial a sintezei unor proteine arată existenţa unor procese distincte atît la nivelul transcripţiei ADN cît şi la nivelul translaţiei pe ribozomi. In general se poate aprecia că sistemul mitocondrial răspunde la tipul de inhibitori procariotici ai sintezei de proteine.
Dar inhibitorii care au jucat un rol important în dovedirea rolului produşilor genelor mitocondriale în

dezvoltarea acestor organele sînt:

- ethidium - inhibitorul transcripţiei ADN-mitocondrial şi al replicaţiei şi
- cloramfenicolul - care inhibă translaţia pe ribozomii mitocondriali, dar nu şi pe ribozomii citoplasmatici.

Aşa cum am mai arătat în cazul citocrom oxidazei şi ATP -azei, rolul produşilor mitocondriali pare să fie constitutiv, întrucît produşii sintezei de proteine mitocondriale sînt esenţiali în dezvoltarea activităţii acestora.

Aşa cum am mai văzut la drojdiile cu capacitate respiratorie facultativă,dezvoltarea activităţii citocrom oxidazei şi ATP-azei necesită nu numai proteine sintetizate de către mitocondrii dar este şi obiect al unei inducţii funcţionale cu oxigen şi al represiei cu glucoză.[28,29]

In sinteza de citocrom oxidază participă cu contribuţii separate atît mitocondriile cît şi faza nucleocitoplasmatică celulară. Deci putem aprecia că sinteza de proteine citoplasmatică şi mitocondrială colaborează independent în asamblarea citocrom oxidazei şi că fiecare din aceste contribuţii în parte este stimulată de către oxigen.[170,457]

In general se consideră că preparatele de citocrom oxidază purificate prin diferite procedee, conţin Cu în cantităţi de aproximativ acelaşi ordin de mărime cu conţinutul în hem.[458,459,460,461]

O serie de cercetători postulează participarea Cu din citocrom oxidază în calitate de componentă oxido reducătoare funcţională a citocrom oxidazei.[459] Sînt însă şi autori care consideră Cu ca o impuritate a preparatelor de citocrom oxidază.[460,461]

Studii de rezonanţă electronică paramagnetică arată că ionul de Cu din citocrom oxidază are calităţile unei constituiente funcţionale ale acestei enzime. Astfel s-a observat că Cu^{2+}din toate preparatele de citocrom oxidază este oxidat paralel cu oxidarea componentelor heminice, uneori cu o viteză asemănătoare.O serie de inhibitori cunoscuţi ai citocrom oxidazei ca: azida şi cianura, reduc complet Cu din enzimă cu formarea de Cu^{+} în condiţiile în care din mediul respectiv dispar semnalele de rezonanţă electronică paramagnetică, datorită Cu^{2+}.Si hidroxilamina inhibă citocrom oxidaza şi în acelaşi timp reacţionează cu ionii de Cu. Hidroxilamina este cunoscută ca un puternic inhibitor al citocrom oxidazei.

Preparatele de porfirină a extrase din inimă de cal pot fi convertite în hemină a.Există o singură grupare prostetică[269,446] pentru citocromii a şi a_3 Porfirina a poate fi considerată ca: 1,3,5-trimetil - 2 - (α hidroxialkil)-4-(β -alkilvinil)-6,7-di-(β-carboxietil)-8-formilporfină.[446]

In procesul de maturizare a globulului roşu în sîngele periferic şi deci în procesul de trecere de la stadiul de reticulocit la eritrocit, se constată o

scădere puternică a capacităţii respiratorii, care în eritrocitul matur dispare complet. Warburg[462] a arătat că restul de consum de oxigen găsit la eritrocite este insensibil la inhibiţia cu CO ca urmare a faptului că din aceste celule lipseşte citocrom oxidaza. Prankerd [463] consideră că pierderea capacităţii respiratorii şi a citocrom oxidazei în procesul de maturizare al eritrocitului se face odată cu dispariţia ultimilor resturi de ADN. Glucoza şi în cazul reticulocitelor inhibă respiraţia acestor celule, inhibînd pe de o parte dezaminarea unor amino acizi care constituie substrate pentru respiraţia acestor celule iar pe de altă parte inhibînd activitatea citocrom oxidazei.[464][465,466]

Faptul că s-a obţinut o reducere a activităţii citocrom oxidazei în reticulocite la tratamentul cu histone bogate în lizină sau în arginină, ne face să postulăm că în aceste celule mai există încă rezidii ale unui mecanism de sinteză a acestei enzime sensibil la inhibiţia cu histonă.[466,524]

Bertles[467] remarcă faptul că maturaţia globulelor roşii este asociată cu conversia ARN în produse cu greutate moleculară mică ce sînt eliminate din celulă. In acelaş sens sînt şi observaţiile altor autori.[468] Scăderea capacităţii de sinteză a proteinelor la reticulocite în procesul de maturaţie, merge paralel cu scăderea fracţiunii ribozomale din aceste celule. Aceeaşi fracţiune pare să fie responsabilă şi pentru capacitatea de sinteză a citocrom oxidazei.

Studiind reacţia citocrom c oxidazei reduse cu oxigenul, Greenwood(469) observă că citocrom oxidaza funcţionează ca o unitate cooperativă conţinînd o moleculă de citocrom a_3, o moleculă de citocrom a şi 2Cu. Molecula de oxigen difuzînd în această unitate cu o viteză de 1×10^8 $M^{-1}sec^{-1}$ reacţionează succesiv cu citocromul a_3 (3×10^4 sec^{-1}), Cu (7×10^3 sec^{-1}), şi citocromul a (7×10^2 sec^{-1}), producînd 2 molecule de apă.

Procesele chimice conţin mai mult de patru etape şi tot ce se poate şti despre acestea este că sînt foarte rapide, intermediarii avînd timp de înjumătăţire mai mici de 10 μsecunde.

Din aceleaşi cercetări, rezultă că citocrom oxidaza redusă conţine proteine heminice numai într-un singur tip de legătură, dar funcţional asociate în perechi în aşa fel încît, dacă membru unei perechi leagă liganzi sau reacţionează cu oxigenul, urmează o modificare conformaţională care împiedică cel de al doilea membru a perechii de a intra în reacţie. Cercetările efectuate în legătură cu fixarea CO arată că, mai puţin de jumătate din totalul conţinutului heminic se leagă de aceasta. (470,471)

Dacă unitatea funcţională a citocrom oxidazei este capabilă să transfere 4 electroni la oxigen cu formare de apă şi de enzimă oxidată, o enzimă denaturată cu o unitate incompletă poate transfera 4 electroni cu formarea, unei enzime conţinînd fierul într-o formă înalt oxidată.

Această formă[472] este similară cu enzima "oxigenată" formată din enzima oxidată şi H_2O_2 ca şi cu formarea acesteia prin folosirea succesivă a ditionitului şi oxigenului, aşa cum a fost descrisă de Orii,[473] sau în condiţiile lipsei activităţii catalazei care deasemeni condiţionează formarea acestei forme de enzimă "oxigenată"
In timpul reacţiei citocrom oxidazei reduse cu oxigenul în infraroşu apare o bandă caracteristică pentru forma oxidată la 820 nm. care creşte cu mărirea concentraţiei de oxigen pînă la o viteză de 6×10^{-3} sec^{-1}.
Această viteză este mai mare decît viteza de oxidare a citocromului a (1×10^3 sec^{-1}) dar mai mică decît viteza maximă de oxidare a citocromului a_3 (30×10^3 sec^{-1})
Banda citocrom oxidazei la 820 nm, forma oxidată pare să fie datorită cuprului.
Cercetările lui Van Gelder[474] arată că în citocrom oxidază cuprul se găseşte în 2 forme şi anume:

- una asociată cu citocromul a_3 accesibilă pentru agenţii chelatori.
- alta asociată cu citocrom a inaccesibilă la agenţii chelatici.

Intrucît agenţii chelatori nu influenţează apariţia benzii la 820 nm, este de presupus că această bandă trebuie atribuită cuprului asociat cu citocromul a. Apariţia benzii la 820 nm ar putea fi interpretată şi în sensul unei oxidări a cuprului asociată cu o polimerizare a enzimei şi cu un rearanjament intramolecular a hemului a şi a hemului a_3. In acest model reacţional,

cu ar fi un intermediar obligatoriu între citocromul a și citocromul a_3.

Pentru biosinteza citocrom oxidazei, de o mare importanță sînt mecanismele care dirijează sinteza porțiunii heminice a acesteia, și în mod deosebit, mecanismele care coordonează acumularea Fe în mitocondrii. Se știe că, în celula animală, sinteza hemului depinde de un sistem multienzimatic, în care componentele enzimatice sînt distribuite între citoplasmă și mitocondrii.
Astfel se știe că mitocondriile, conțin enzimele care catalizează, formarea acidului δ-aminolevulinic din glicină și CoA[476,477] formarea protoporfirinei IX din coproporfirinogen,[477,478] și încorporarea Fe feros în ciclul porfirinic.[479]
Incorporarea finală a Fe feros în protoporfirina IX este catalizată de către o ferochelatază (protohem ferroliază E.C.4.99.1.1) enzimă puternic legată la porțiunea matricială a membranei interne mitocondrială.[480]
Pentru ca ionii de Fe să ajungă în acest compartiment mitocondrial, trebuie să traverseze membrana externă și internă mitocondrială.

Goodman[481] descrie acumulări masive de Fe în mitocondriile eritroblastelor provenite de la pacienți cu anemie. Aceasta demonstrează permiabilitatea membranei interne mitocondriale pentru ionii de fer.
Acumulări anormale de Fe au fost observate și în alte maladii cu perturbări în biosinteza hemului.[481]
In mitocondriile din celule animale a fost demonstrată

o acumulare de Fe,independentă de energie în condiţiile în care acestea au fost incubate cu complexe de adenin nucleotide ferice[482] sau cu complexe fero-ferice de 8 hidroxichinolină.[483] In sfîrşit s-a observat că ionii ferici stimulează etapa III-a şi etapa IV-a.respiratorie din mitocondriile izolate din ficat de şobolan.
Acumularea ionilor de Fe în mitocondrii se face pe două căi:

- un mecanism independent de energie
- un mecanism dependent de energie,pH şi temperatură.

Ambele mecanisme necesită Mg^{2+},sînt inhibate de P_a şi de agenţi chelatori ca EDTA,arătînd un **maxim** de eficienţă la concentraţii de Fe de 0,2-0,3 mM.
La pH de 7,2 acumularea dependentă de energie este de circa 10-15 nM/mg proteină şi are loc în mai puţin de 45 sec.Acumularea independentă de energie are loc cu o rată de circa 25 nM Fe/mg proteină/min. cu o acumulare maximală de 180-240 mM Fe/mg proteină.

Mecanismul de acumulare a Fe dependent de energie este răspunzător de transportul prin memebrana mitocondrială internă a Fe.[484]
Adăugarea la o suspensie mitocondrială a decuplantului F.C.C.P (carbonil-cianid-p-trifluoro-metoxifenilhidrazonă) produce o scădere semnificativă a acumulării Fe demonstrînd că cel puţin o parte din fierul acumulat este dependentă de potenţialul energetic al membranei mitocondriale interne.Si cianura inhibitor specific al

respirației mitocondriale, inhibă paralel cu aceasta și trasnportul ionului fer.(484)

Lanțul transportor de electroni mitocondrial.

Lanțul transportor de electroni mitocondrial este constituit dintr-un sistem de catalizatori oxido-reducători care mediază oxidarea ionului de hidrogen de către oxigenul molecular. Această definiție a lanțului respirator este astăzi acceptată de aproape toți cercetătorii care lucrează în acest domeniu. Totuși există încă opinii foarte diferite în ceea ce privește:

- natura și numărul catalizatorilor din catena respiratorie,
- secvența componentelor din acest lanț,
- structura și dimensiunile fizice ale lanțului respirator,
- localizarea lanțului respirator în mitocondrii.

Conceptul despre lanțul respirator ca unitate stucturală cu poziție precisă, dimensiuni și compoziție precisă, se sprijină pe dovada faptului izolării acestuia. Dacă lanțul respirator este o unitate fizică atunci prin diferite metode trebuie să fie extractibil și izolabil. Dacă nu este o unitate fizică ci o colecție de componente structural separate atunci lanțul respirator va fi neizolabil. Izolarea lanțului respirator demonstrează existența unei unități morfologice în structura căreia este localizat lanțul respirator. In procesul de dezintegrare în etape a mitocondriei în particule

cu greutate moleculară din ce în ce mai mică, se tinde la izolarea porţiunilor ce conţin lanţul respirator complet, şi la stabilirea exactă a cantităţii şi proporţiilor în care participă cantitativ în alcătuirea lanţului respirator diferitele elemente constitutive ale acestuia. Astfel va putea fi precizată apartenenţa unor componente structurale şi funcţionale lanţului respirator. Se ştie că în ultimii ani, catenei respiratorii clasice i s-au adăugat componente noi oxido-reducătoare de tipul coenzimei Q, cuprului şi ferului nehemínic.

Dar prezenţa unor componente în particulele morfologico-structurale ce conţin lanţul respirator nu înseamnează obligatoriu şi dovada participării funcţionale a componentei respective în procesul de transfer de electroni.

Izolarea lanţului transportor de electroni în formă de particule submitocondriale

Prin diferite mijloace chimice sau fizice, mitocondriile pot fi rupte şi deci fragmentate în particule submitocondriale conţinînd lanţul transportor de electroni complet. Dovada integrităţii acestui lanţ a fost făcută prin măsurarea capacităţii de a cataliza oxidarea antimicin-sensibilă a succinatului şi a NADH de către oxigenul molecular.

Prin studii de microscopie electronică(485) prin studierea caracteristicilor de sedimentare şi a pierderii capacităţii de transport a acidului citric şi

a capacităţii de oxidare a acizilor graşi[486] s-a demonstrat originea mitocondrială a acestor particule.

Studii electron micrografice au demonstrat că preparatele particulate obţinute prin tratament chimic (alcool şi fosfat, soluţii alcalin diluate[487,488] digitonină,[489] sau prin tratament fizic (ultrasunete[490] sfărîmarea cu bucăţi mici de sticlă[491] constă în principal din fragmente ale membranei mitocondriale interne, în amestec sau legate de materialul matricial (proteine structurale). In ceea ce priveşte membrana externă datele sînt încă contradictorii; în orice caz aceasta suferă fragmentări şi solubilizări mult mai mari de pe urma tratamentelor indicate.

Intrucît există asemănări între membrana mitocondrială externă şi reticulul endoplasmatic, se postulează ideea originii acesteia, a derivării acesteia din reticulum endoplasmatic.[492] Deşi există similarităţi în compoziţia lipidică, prezenţa unor enzime în reticulum endoplasmatic şi membrana mitocondrială externă (citocromul b_5, şi o NADH-citocrom c reductază insensibilă la rotenonă), totuşi sînt şi deosebiri între aceste două structuri subcelulare. Astfel numai membrana mitocondrială externă conţine monoaminoxidaze, iar numai reticulum endoplasmatic conţine o NADPH-citocrom c reductaza, citocromul P_{450}, glucozo-6-fosfataza ca şi o oxidază cu funcţii complexe.

Studii recente postulează un schimb de fosfolipide între membrana mitocondrială externă şi micro-

zomi şi lipsa acętui schimb între membrana internă şi membrana externă.[493]

Lehninger[494] consideră membrana externă mitocondrială ca un strat protectọr al mitocondriei faţă de agresiunea microorganismelor.

Există date care aseamăņă membrana bacteriană cu membrana internă mitocondrială. Ambele tipuri de membrană au un conţinut mare de cardiolipină şi includ aportul de fosforilare oxidativă al celulei.

Atît bacteriile cît şi mitocondriile conţin ADN, sintetizează proteine şi acizi nucleici. Există însă fără îndoială şi deosebiri esenţiale între aceste două tipuri de membrane. Dacă s-ar considera mitocondria de origine parazitară, atunci membrana externă ar reprezenta contribuţia celulară la stbilirea relaţiilor simbiotice dintre mitocondrie şi celulă. Membrana externă deci, ar izola mitocondria de restul celulei. Avînd un conţinut corespunzător fosfolipidic, membrana externă este uşor permeabilă pentru moleculele mici ca: nucleotide, săruri, zaharoză etc. Macromoleculele nu permează prin membrana externă, deşi în 1970 Racker[495] arăta că mitocondriile din inimă de bovine au membrana externă permeabilă, pentru proteine ca citocromul c şi γ-globuline. Unii consideră această observaţie ca fiind datorită lezării membranei externe în timpul izolării mitocondriilor.[496]

Aşa cum am mai arătat, principala funcţie a membranei interne mitocondriale, constă în activitatea lan-

ţului respirator încorporată în această structură. Activitatea respiratorie a membranei interne mitocondriale, a fost stabilită prin cercetări efectuate în trei direcţii importante:

= izolarea de proteine pure capabile să catalizeze reacţii de oxidoreducere cu donatori artificiali de electroni sau cu acceptori de elctroni,

- izolarea de complexe care catalizează segmente din lanţul respirator cu scopul de a fi folosite în reconstituirea întregei catene respiratorii pentru oxidarea unor substanţe naturale ca NADH sau succinat,

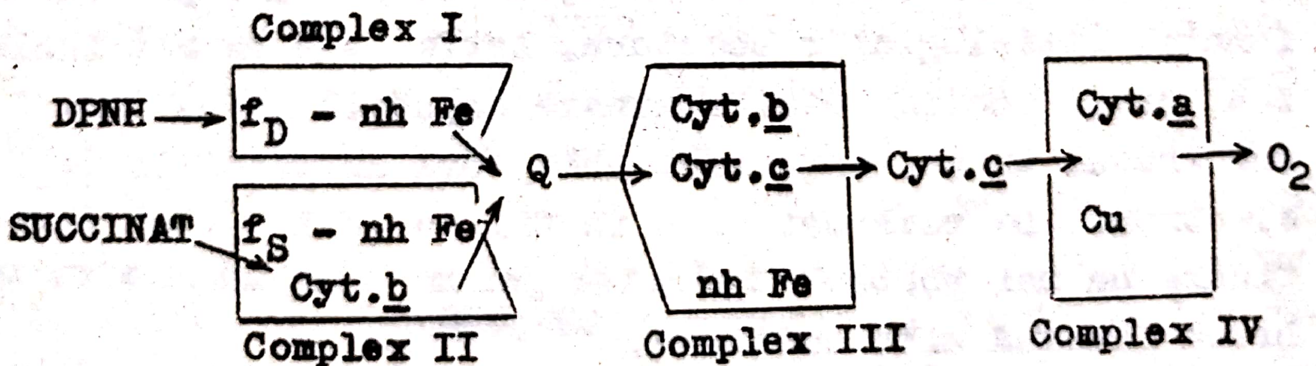
- izolarea unor componente individuale ale lanţului respirator cu scopul de asemenea de a fi folosite în reconstituirea întregei catene respiratorii pentru oxidarea substratelor naturale.

In prima direcţie s-au izolat proteine, s-au purificat şi s-a constatat că în timpul acestor procese apar modificări substanţiale structurale care pot altera funcţia fiziologică a acestora. Astfel s-a reuşit izolarea unei succinat dehidrogenaze capabilă să oxideze succinatul în prezenţa unor acceptori artificiali de electroni. De remarcat este faptul că enzima după purificare nu mai poate fi folosită pentru recombinare cu membrana internă mitocondrială.[497,498]

Green[499] formulează catena trasportoare de electroni mitocondrială sub forma a patru complexe primare şi a unor componente mobile (coenzima Q şi citocromul c). Din figura următoare se vede că toate componen-

tele incluse în suprafaţa limitată reprezintă complexele primare şi sînt deci componentele fixe ale lanţului respirator.Secvenţa din interiorul complexului nu este specificată, iar stoechiometria este prezentată numai pentru compuşi selectaţi (marcaţi cu numere în paranteze). Se folosesc următoarele prescurtări :

- f_D = flavoproteină fără Fe cu activitate NADH-dehidtrogenazică
- f_S = flavoproteină fără Fe cu activitate succinat dehidrogenazică
- nh Fe = Fe neheminic
- Cyt = citocromi
- Q = coenzima Q



Din membrana mitocondrială internă;(500,501) s-a izolat o NADH dehidrogenază activă în reconstrucţia complexului I.

In complexul I atît NADH dehidrogenaza, cît şi o proteină care conţine Fe şi S par să fie protejate de către o pătură hidrofobă de lipide şi proteine structurale. Această structură este indicată de faptul că eliberarea NADH dehidrogenazei şi a proteinei -Fe,S din complexul I se face numai după tratarea cu agenţi ca : uree, guanidin hidroclorid, perclorat de sodiu şi tiocianat. Aceşti agenţi acţionează asupra structurii şi lipofiliei complexului I, de faptul că ditionitul nu este capabil să reducă NADH dehidrogenaza şi proteina Fe,S din complexul intact, dar le reduce rapid după solubilizarea acestora;ca si de faptul că chelatori ionici ca Triton şi bathofenantrolina sulfonat nu reacţionează cu componenta Fe din complexul I intact dar reacţionează cu Fe din acest complex eliberat după tratare cu agenţii indicaţi mai sus.

In complexul I reducerea fericianurei de către NADH dehidrogenază nu este inhibată de către PCMB (paraclormercuribenzoat)dar este imediat inhibată după solubilizarea enzimei.

Spre deosebire de NADH dehidrogenaza solubilă complexul I are o foarte mică activitate menadion reductazică şi diclorfenolindofenol reductazică(DCPIP) şi nu are nici un fel de activitate citocrom c reductazică in-

sensibilă la antimycină.

Albracht şi Slater[502] izolează din complexul I şi III la tratament cu pentan o NADH citocrom c reductază fără coenzima Q şi sensibilă la rotenonă.

Din mitocondrii, cu ajutorul unor enzime proteolitice sau prin tratament cu dodecilsulfat, s-a izolat citocromul b activ în recombinare cu succinat dedidrogenaza şi cu fosfolipide în formarea unui complex capabil să reducă coenzima Q_{10} în prezenţa succinatului şi în condiţiile în care citocromul b pare să participe direct în procese oxidoreductive.[503,504] Preparatele de citocrom b tratate cu dodecilsulfat îşi pierd activitatea catalitică, dar îşi păstrează rolul structural în calitate de componentă a membranei interne mitocondriale în timp ce citocromul b expus la proteoliză îşi păstrează activitatea catalitică pierzîndu-şi rolul structural.

Horstman[505] arată că o altă componentă a membranei interne şi anume aşa numitul factor F_1 îşi pierde capacitatea de a funcţiona în calitate de componentă structurală a membranei după tratarea cu enzime proteolitice fără pierderea activităţii ATP-azice a acesteia.

Pullman [506] arată că tratarea cu tripsină sau chimotripsină duce la activarea ATP-azei mitocondriale ca rezultat al distrugerii unui inhibitor deosebit de sensibil la digestia proteolitică. Aceste constatări au determinat pe cercetători ca în procesul de pu-

rificare a ATP-azei să elimine acest inhibitor prin separarea enzimei din complex.

Inhibitorul ATP-azei mitocondriale pare să fie un factor implicat în procesul de fosforilare oxidativă, cu rol în controlul acestui proces.

Din membrana internă mitocondrială s-a izolat citocrom c cu efect reconstitutiv.[507,508]

Dificultăţile reale întîmpinate în efortul de reconstituire a lanţului respirator din componentele individuale s-au datorit în special labilităţii citocromului b.

S-a mai observat că reconstituirea catenei respiratorii în prezenţă de fosfolipide extrase din soia, a fost mai activă dar mai puţin stabilă decît reconstituirea efectuată cu fosfolipide obţinute din mitocondrii de inimă de bovine. O capacitate respiratorie maximală s-a obţinut în condiţiile în care raportul fosfolipide/proteine este în jur de 0,5.

Yamashita şi Racker[508] reconstituie un complex care catalizează oxidarea succinatului de către oxigenul molecular, prin combinarea de enzime purificate din mitocondrii de inimă de bovine, cu fosfolipide şi coenzima Q_{10}.Activitatea este dependentă de succinat dehidrogenază,citocromii ,b, c, c_1,şi citocrom oxidaza dar nu necesită adăugarea de proteină cu Fe neheminic. Reconstituirea complexului necesită o perioadă de timp îndelungată, iar viteza de oxidare a succinatului este comparabilă cu aceea obţinută cu particulele fosfori-

lante submitocondriale. S-a izolat din membrana internă mitocondrială și citocrom oxidază. Cu toate că citocrom oxidaza izolată este activă în reconstituirea complexului succin oxidazic, nu s-a putut demonstra că enzima a dobîndit toate proprietățile citocrom oxidazei legate de membrană. De fapt, concentrațiile mari de citocrom c necesare pentru saturarea acestui sistem, sugerează că prin purificare, enzima suferă modificări esențiale.

<u>In a doua direcție</u>, se fac încercări de separare din lanțul respirator a unor segmente capabile să catalizeze reacții parțiale.
Hatefi(509) descrie patru astfel de complexe cu ajutorul cărora poate fi reconstituit lanțul respirator pentru a catáliza oxidarea NADH și a succinatului. Complexul I conține NADH dehidrogenaza care catalizează oxidarea NADH în prezența unor acceptori artificiali ca: fericianura sau fenazin metosulfatul; acest complex mai conține și proteine cu Fe nehеminic și coenzima Q.

S-a observat că cele două proteine separabile, acționează secvențial în reducerea coenzimei Q_{10}.

Complexul II conține succinat dehidrogenază și citocromul b; acesta catalizează reducerea coenzimei Q_{10} de către succinat. Complexul III conține citocrom b, citocrom c și citocrom c_1 și de asemenea o proteină cu Fe nehеminică. Acest complex catalizează reducerea citocromului c de către coenzima Q redusă.

Complexul IV este reprezentat de citocrom

oxidază şi conţine citocromii a şi a_3, catalizînd oxidarea citocromului c redus.

Toate complexele conţin fosfolipide, şi în anumite condiţii interacţionează unul cu altul în vederea reconstituirii lanţului respirator.Complexele I, III, şi IV dacă se reconstituie,catalizează oxidarea NADH. Asocierea complexelor II, III, şi IV duce la oxidarea succinatului.Sistemele reconstituite au proprietăţile lanţului respirator din membrana mitocondrială în ceea ce priveşte sensibilitatea la inhibitori ca rotenona sau antimycina.[500]

Complexele reconstituite nu catalizează fosforilarea oxidativă.

<u>In a treia direcţie</u> se fac încercări de izolare a componentelor individuale ale lanţului respirator cu scopul de a se păstra activitatea în procesul de reconstituire a lanţului.Deocamdată se încearcă reconstituirea proceselor oxidative, scopul major dar deocamdată mai îndepărtat este de a se reuşi o reconstituire a procesului complex de fosforilare oxidativă.S-au izolat 5 enzime din catena respiratorie fără pierderea activităţii reconstitutive.Acestea sînt: succinat dehidrogenaza, citocrom b, citocrom c_1, citocrom c şi citocrom oxidaza. Dintre acestea numai succinat dehidrogenaza[510], citocrom c[507] şi citocrom oxidaza[511] sînt capabile de activitate reconstitutivă atît în procesul de fosforilare cît şi în procesul de oxidare.Amestecarea acestor

cinci componente în prezență de fosfolipide și de coenzima Q_{10} duce la formarea unui complex care catalizează oxidarea succinatului cu o capacitate comparabilă cu aceea a particulelor submitocondriale fosforilante. Oxidarea este complet inhibată de antimycina A și de cianură.(508)

Tratamentul fizic și chimic al mitocondriilor duce la fragmentarea membranei interne în particule mici care conține un număr variabil de lanțuri transportoare de electroni intacte. Acestui tip de particule i s-a dat denumirea de ETP (electron-transfer-particule).(487)

Separarea lanțurilor transportoare de electroni de proteinele structurale matriciale necesită utilizarea dificilă a detergenților.

La un grad mare de puritate a lanțului respirator izolat, conținutul în citocrom a al preparatului este de circa 6 m/umoli/mg proteină în comparație cu conținutul în citocrom a de 1,3 din mitocondriile intacte.

Pe baza datelor obținute în legătură cu structura lanțului respirator,(499) se poate presupune că într-o unitate particulată găsim o moleculă de flavină a succinat dehidrogenazei și șase molecule de citocrom a pe lanț, ceea ce dă lanțului respirator o greutate moleculară de 1×10^6.

In formă izolată, lanțul respirator este lipsit de aportul de proteină care cuplează transportul

de electron cu sinteza de ATP, și de asemeni este lipsit de enzimele ciclului acidului citric ca și de proteinele contractile.In acest context, catena respiratorie poate fi imaginată sub forma unui set "fixat" de proteine care sînt prezente într-o proporție moleculară constantă în timpul procesului de izolare.Citocromul c și coenzima Q se extrag în concentrații diferite în timpul procesului de izolare, de aceea sînt considerate componente variabile ale lanțului respirator cum s-a văzut din schema prezentată mai înainte.

Pornind de la faptul că izolarea lanțului transportor de electroni este posibilă sub forma unei unități particulate liberă de proteinele structurale și care conține aceleași componente fixe în aceleași proporții moleculare ca și acelea găsite în lanțul mitocondrial transportor de electroni s-a postulat că lanțul respirator este o unitate integrată cu o poziție fixă și structură exactă.

Legătura dintre diferitele componente ale lanțului respirator este fie proteină-proteină,fie proteină-lipid.Este de menționat că macrounitățile transferului de electron sînt compuse din subunități care nu se separă în timpul procesului de izolare.[499]

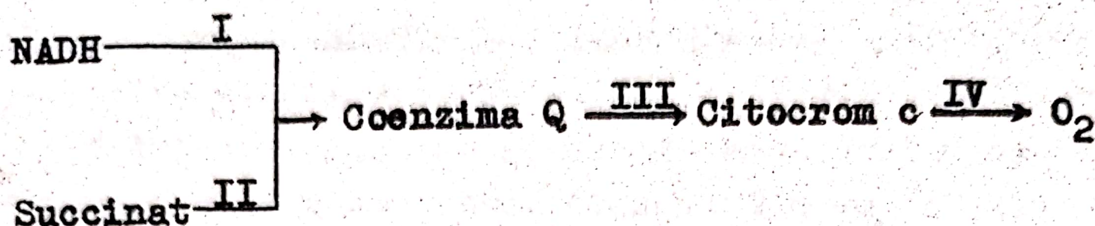
Lanțul mitocondrial transportor de electroni poate fi separat în patru complexe primare fundamentale fiecare dintre ele reprezentînd un segment al lanțului respirator.[216,512,513,514]
Combinarea celor patru complexe reface complet catena

respiratorie.Fiecare complex reprezintă o unitate funcţională şi morfologică separată.Reacţiile catalizate de fiecare complex nu pot avea loc dacă proteinele care cuprind complexul sînt separate unele de altele şi adăugate ca entităţi separate. In acest sens complexul este o unitate integrată funcţional care nu poate fi despărţită în proteine componente, fără pierderea completă a activităţii integrate.[499]

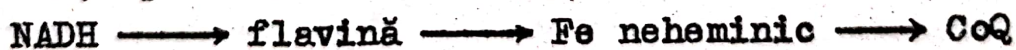
In studiile în legătură cu reconstituirea lanţului respirator s-a stabilit faptul că cele patru complexe pot reasocia spontan pentru a forma catena trasportoare de electroni completă şi că fiecare unitate a lanţului respirator este constituită din, cîte o moleculă din fiecare din aceste patru complexe.
Greutatea moleculară a celor patru complexe izolate este aproximativ egală cu greutatea moleculară a catenei respiratorii purificate deşi sînt date care arată că greutatea catenei poate să fie ceva mai mare întrucît în asamblarea lanţului respirator poate să participe şi proteinele structurale.
Suma greutăţilor moleculare a celor patru complexe[515] este de $3,5x10^6$.

Secvenţa componentelor din lanţul respirator

Green[499] dă următoarea schemă a componenţilor din lanţul respirator:



In oxidarea NADH catalizată de complexul I, componenta flavoproteinică şi ferul din proteina cu fer neheminic, suferă o schimbare de valenţă. Ambele componente sînt atît de repede reduse de către NADH încît este foarte greu de precizat secvenţa participării acestora în reacţiile de oxidare. Totuşi, se presupune că ordinea NADH ⟶ f ⟶ Fe pare cea mai probabilă întrucît s-au obţinut preparate în care capacitatea de oxidare a NADH de către o flavoproteină în prezenţa unor acceptori artificiali de electroni este conservată în timp ce reducerea Fe neheminic de către NADH este complet blocată. Faptul că NADH poate reduce flavoproteina în condiţii în care Fe este nereductibil, pledează pentru considerarea grupării flavinice ca acceptor primar de electroni. In aceste condiţii Fe neheminic va fi situat pe suprafaţa orientată înspre O_2 a flavinei, după schema :[499,516]



Studii de rezonanţă electronică paramagnetică de spin [499] au precizat oxidarea rapidă a flavinei reduse şi a Fe neheminic de către CoQ.
Aceleaşi argumente explică şi secvenţa reacţiilor de oxidare a succinatului în complexul II în sensul redat de schema:

Succinat ⟶ flavină ⟶ Fe neheminic ⟶ CoQ

Complexul II conţine şi o moleculă de citocrom b pe moleculă de complex.Rolul citocromului b în acest complex nu a fost încă bine precizat.Se bănueste însă,că ar putea contribui la legarea complexului I de complexul II.Si relaţiile spaţiale ale citocromului b cu complexul III sînt încă insuficient cunoscute.

Complexul III catalizează oxidarea coenzimei Q reduse[512] de către citocromul c.

In structura complexului III s-au identificat 3 componente oxido-reducătoare şi anume:

- citocromul b (2 molecule)
- proteină cu Fe neheminic
- citocromul c_1

In prezenţa antimycinei A,citocromul b este rapid redus de către coenzima Q redusă în condiţiile în care nici proteina cu Fe neheminic şi nici citocromul c_1 nu sînt reduse.[512,517]

Aceste date demonstrează poziţia citocromului b în lanţul respirator în imediata apropiere a coenzimei Q.

Fe neheminic şi citocromul c_1 sînt rapid reduse de către coenzima Q redusă.

Cu ajutorul acestor date şi prin măsurători a potenţialului de oxido-reducere a Fe neheminic şi citocromului c_1 s-a ajuns la următoarea formulare a acestui segment din lanţul respirator:[518]

CoQ redusă ⟶ Cit.b ⟶ Fe neheminic ⟶ Cit c_1 ⟶ Cit.c

Oxidarea citocromului c redus de către oxigenul molecular este catlizat de complexul IV în care găsim cel puțin trei componente:

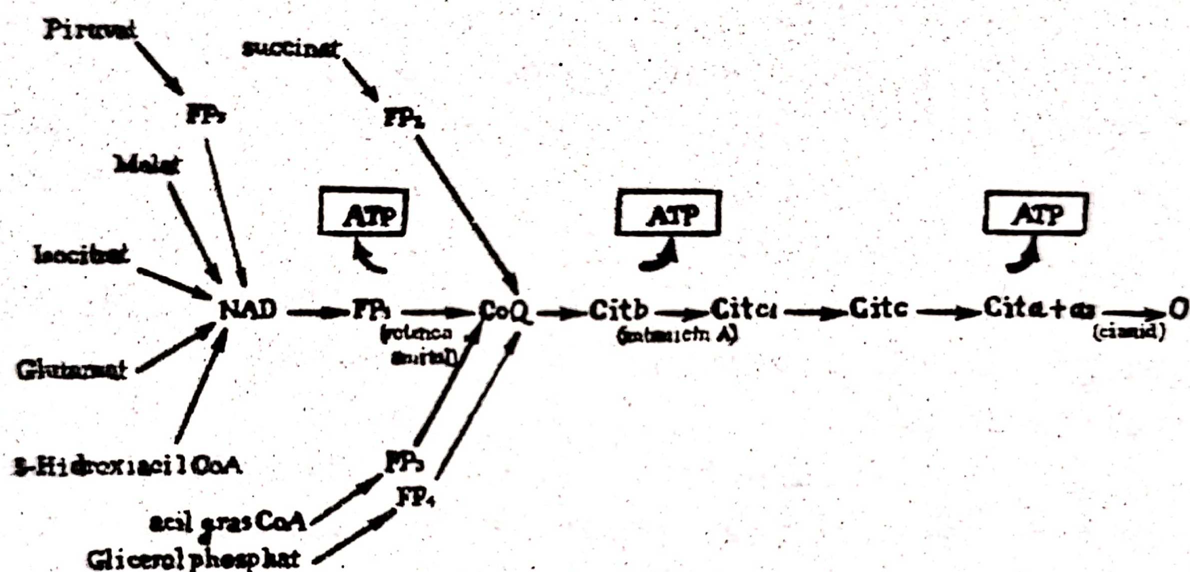
- citocromul a,
- citocromul a_3,
- cuprul.

Studii spectrofotometrice efectuate de Gibson[519] au demonstrat că în secvența reacțională a lanțului respirator, citocromul a este prima specie redusă de către citocromul c redus, și că citocromul a redus la rîndul lui este acela care reduce citocromul a_3. La rîndul său, citocromul a_3 este oxidat de către oxigenul molecular.

Lehninger[520] în schema de mai jos propune următoarea secvență reacțională a transferului de electroni în catena respiratorie, apreciind că aceasta este în concordanță cu potențialele redox ale diferiților transportori de electroni, în sensul că potențialul devine din ce în ce mai pozitiv cu cît electronul trece mai departe de la substrat la oxigen. Această schemă este susținută și de faptul că experimente reconstructive <u>in vitro</u> cu transportori de electroni izolați indică tocmai această secvență reacțională. Este cunocut faptul că NADH poate reduce NADH dehidrogenaza, dar nu poate reduce direct citocromii b, c sau $a+a_3$.

De asemeni, NADH dehidrogenaza nu poate reacționa direct cu citocromul $a+a_3$ ci necesită prezența citocromilor b și c.

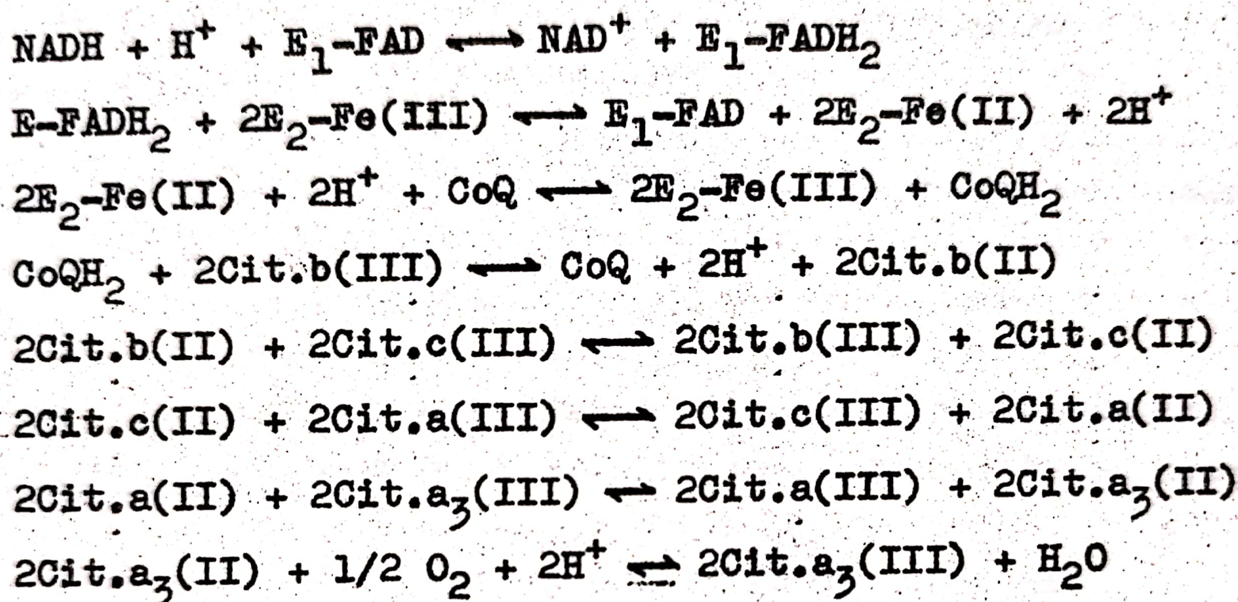
Schema de mai jos este confirmată şi de izolarea comple-xelor despre care am vorbit mai înainte cu componentele de transportori cunoscute.



Lanţul respirator în care sînt arătate locurile de inhibiţie ale transportului de electroni şi loçurile de conservare ale energiei (ATP).

Din tabelul de mai jos se vede secvenţa reacţională a transportului de electroni aşa cum este prezentată de Lehninger.[520]

Reacţiile secvenţiale ale transportului de electroni



$$NADH + H^+ + E_1\text{-}FAD \longleftrightarrow NAD^+ + E_1\text{-}FADH_2$$

$$E\text{-}FADH_2 + 2E_2\text{-}Fe(III) \longleftrightarrow E_1\text{-}FAD + 2E_2\text{-}Fe(II) + 2H^+$$

$$2E_2\text{-}Fe(II) + 2H^+ + CoQ \longleftrightarrow 2E_2\text{-}Fe(III) + CoQH_2$$

$$CoQH_2 + 2Cit.b(III) \longleftrightarrow CoQ + 2H^+ + 2Cit.b(II)$$

$$2Cit.b(II) + 2Cit.c(III) \longleftrightarrow 2Cit.b(III) + 2Cit.c(II)$$

$$2Cit.c(II) + 2Cit.a(III) \longleftrightarrow 2Cit.c(III) + 2Cit.a(II)$$

$$2Cit.a(II) + 2Cit.a_3(III) \longleftrightarrow 2Cit.a(III) + 2Cit.a_3(II)$$

$$2Cit.a_3(II) + 1/2\ O_2 + 2H^+ \rightleftharpoons 2Cit.a_3(III) + H_2O$$

Sînt folosite următoarele prescurtări :

E_1-FAD (NADH dehidrogenaza)

E_2-Fe(III) (forma oxidată a proteinei Fe neheminic)

Cit.b(III) (forma oxidată a citocromului b),etc.

Din schema pe care am arătat-o mai sus rezultă că în timpul transportului de electroni de la substrat la oxigen, la trei nivele se eliberează ATP.

Metabolismul glicolitic ca parte a metabolismului energetic este activ în absenţa oxigenului. Glicoliza a putut fi reconstituită în soluţii din enzime purificate şi cofactori care <u>in vitro</u> pot îndeplini aproximativ aceleaşi funcţii care le îndeplinesc în celula vie.

Calea aerobă a vieţii foloseşte un proces de conservare a energiei denumit proces de fosforilare oxidativă, care deocamdată nu a putut fi reconstruit în soluţii. Aparent, aşa cùm am arătat şi mai sus, pentru procesul de fosforilare oxidativă, este necesară o organizare structurală a enzimelor constitutive.Această structură este conservată şi adăpostită în mitocondrii. Relaţia structură-funcţie în cazul mitocondriei şi a procesului de fosforilare oxidativă,are un grad de complexitate,care deocamdată cu mijloacele pe care ştiinţa contemporană le are la dispoziţie nu a putut fi clarificat.

Arhitectura de bază chimică a catenei transportoare de electroni,sub forma de catalizatori şi de complexe de catalizatori,pare să fie universală pentru mitocondriile din toate ţesuturile animale.Cu toate acestea există deosebiri în detaliile organizării lanţului transportor de electroni în diferite ţesuturi şi la diferite specii de animale. Astfel α-glicerofosfat dehidrogenaza este asociată cu lanţul transportor de electroni al mitocondriilor din muşchiul scheletic, dar nu este asociată cu lanţul transportor din inimă.

Raportul dintre citocromul a şi citocromul b şi numărul de molecule de citocrom c sau de NADH sau de coenzimă Q pe lanţ respirator variază în funcţie de sursa mitocondriilor.

Studii electron microscopice efectuate pe un număr important de sisteme mitocondriale şi pe aceleaşi

sisteme din microorganisme, au arătat un aranjament unitar, invariabil a particulelor asociate cu funcţia de transfer de electroni.[522] Aceste particule au o poziţie asemănătoare şi o formă şi orientare asemănătoare, indiferent de origine. Si această constanţă a formei şi localizării este un simbol al unei unităţi morfologice precise în care este închis lanţul transportor de electroni.Complexele din lanţul respirator sînt orientate pentru cuplarea fluxului de electroni cu sinteza de ATP şi mecanismul acestei orientări depăşeşte unele mici detalii modificate ale lanţului respirator întîlnite la diferite specii.[523]

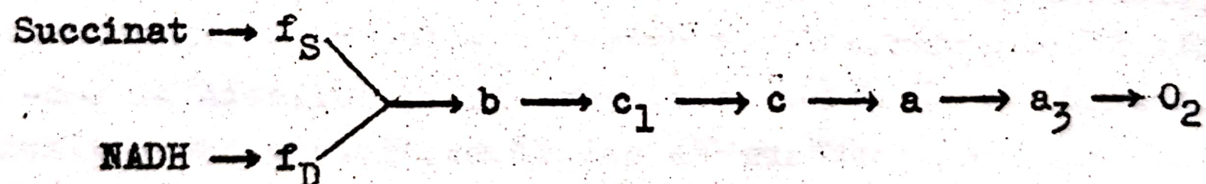
O demonstraţie deosebit de strălucită a caracterului particulelor transportoare de electroni a dat-o Mahler[525,526] care comparînd particulele transportoare de electroni din celule de drojdie cu particule transportoare de electroni de la mutante de drojdie cu deficit în componente citocromice, observă că absenţa citocromilor de la celulele mutante nu se reflectă în particulele transportoare de electroni. Acestea au acelaşi loc şi aceleaşi proprietăţi generale ca şi celulele normale. Leziunile rezidă în sinteza grupării heminice şi nu a componentei proteinice şi de aceea în realitate celulele mutante sau mai bine zis lanţul respirator al acestor celule conţin numai apoproteine şi nu citocromi compleţi.

Menţionăm şi faptul că Chance propune un lanţ transportor de electroni mitocondriali care nu admite

existența celor patru complexe și care nu include coenzima Q, Fe neheminic și Cu în calitate de componente ale catenei respiratorii și care nu admite existența a mai mult de o moleculă de citocrom b și a, pentru fiecare catenă respiratorie.

Lanțul transportor de electroni postulat de Chance presupune existența citocromilor ca monomeri în lanțul respirator capabili să reacționeze direct unul cu celălalt.

Redăm mai jos schema lanțului respirator postulat de Chance[523] din care se vede existența unei molecule din fiecare componentă înserată în schemă.
In schemă, cu f_D este notată flavoproteina fără Fe și cu activitate NADH-dehidrogenazică ; iar cu f_S este notată flavoproteina fără Fe cu activitate succin dehidrogenazică.



Formularea lanțului transportor de electroni dată de Chance nu este acceptată de o bună parte din cercetătorii din acest domeniu. Precizăm încă odată că cea mai mică subunitate din lanțul transportor de electroni care a putut fi izolată fără pierderea activității enzimatice este complexul. Dacă complexul este mai departe fracționat în componentele proteice, se pierde ac-

tivitatea.

O serie de lucrări recente, arată că mitocondriile intacte izolate, pot suferi două tipuri de modificări ultrastructurale :

- modificări ultrastructurale pasive cauzate de modificări în presiunea osmotică a mediului în care sînt suspendate mitocondriile,
- modificări ultrastructurale active, dependente de activitatea catenei respiratorii.

Modificările ultrastructurale implică în primul rînd membrana mitocondrială internă şi matricea, şi constau într-o strîngere sau într-o extindere a compartimentului intern, însoţite de modificări în configuraţia membranei interne.(527,528,529,530)

Este bine cunoscut faptul că procesul de transfer de energie în mitocondrie, este însoţit de modificări conformaţionale ale membranei interne.

Buffa(531) remarcă două tipuri de modificări în mitocondriile tratate cu agenţi decuplanţi ai fosforilării oxidative şi anume:

- modificări considerate fiziologice, observate la mitocondriile provenite din celule în condiţii normale,
- modificări patologice.

Tratamentul cu decuplanţi, duce la creşterea opacităţii mitocondriei, cu creşterea spaţiilor intracriste şi cu dispariţia limitelor dintre membrana internă şi matrice. Aspectul mitocondriei este similar cu

aşa numitul aspect "condenşat" descris de Hackenbrock.(527) Volumul mitocondriei scade. Decuplarea procesului de fosforilare oxidativă este asociată cu contracţia sacului mitocondrial intern, format de membrana internă şi matrice.

S-a observat că oxidarea succinatului are loc la nivelul suprafeţei interne a membranei interne în timp ce citocromul c este accesibil preferenţial pe o cale de pe suprafaţa externă a membranei interne. De asemeni s-a observat că azida reacţionează cu citocrom oxidaza de pe suprafaţa matricială a membranei şi că sistemul enzimatic responsabil pentru procesul de fosforilare este asociat cu aceeaşi suprafaţă a membranei. Pe această bază, se consideră că toate componentele lanţului respirator sînt orientate transversal în interiorul membranei.

Este de asemeni cunoscut faptul că suprafaţa externă şi internă a membranei mitocondriale interne prezintă diferenţe importante din punct de vedere chimic.

Studii electron micrografice ale membranei interne ca şi studiile asimetriei densităţii celor două suprafeţe ale membranei, demonstrează clar că cele două suprafeţe ale membranei interne sînt intrinsec diferite şi că există o asimetrie chimică în structura membranei mitocondriale interne. Această asimetrie structurală, împreună cu direcţionarea funcţională, face să se presupună o asamblare asimetrică a consti-

tuenţilor macromoleculari ai membranei interne şi să se aprobe ipoteza organizării vectoriale a componentelor lanţului oxidativ din interiorul membranei.(532)

Aşa cum am văzut, procesul de fosforilare oxidativă şi la fel cu acesta procesul de fosforilare fotosintetică, sînt descrise în literatură ca procese de fosforilare asociate cu transferul de electroni. Aceste procese sînt constituite din secvenţa a două tipuri de particule şi anume, particule oxidoreducătoare adică 2H , H^- sau $2e^-$ şi particule formatoare de legături macroergice (~) terminate cu formarea de adenozin trifosfat (ATP).

Enzimele şi transportorii catalitici care canalizează aceste fluxuri în mitocondrii, cloroplaste şi microorganisme, sînt astfel organizate încît există un grad variabil de cuplare între acestea.

Rezultatul final al cuplării dintre cele două fluxuri (de electroni şi de energie) din procesul de fosforilare oxidativă din mitocondrii, este acela că paralel cu traversarea lanţului respirator de către fiecare pereche de electroni, se formează trei molecule de ATP din ADP şi P_a. Acest cuplu reacţional poartă denumirea de fosforilare oxidativă şi este specificat drept coeficient de P/O sau coeficient de P/2e cu o valoare limită de 3.

Fosforilarea oxidativă.

Cuplarea procesului de fosforilare a ADP la respirația aerobă, a fost postulată pentru prima dată de Engelhardt[581] din Uniunea Sovietică, în perioada anilor 1930.

Prin lucrarea lui Belitzer[533] se sugerează că activitatea lanțului respirator este cuplată cu sinteza de ATP. Dovezi concrete și sigure în această direcție au fost aduse de Friedkin și Lehninger[534] în 1949, și ulterior de un număr important de alți cercetători.[535,536]

Prin cercetări efectuate pe mitocondrii izolate, s-a observat că aceste structuri catalizează oxidarea intermediarilor ciclului acizilor tricarboxilici și acizilor grași, și mai mult decît atîta că acest proces este însoțit de fosforilarea oxidativă. Studii ulterioare au dus la concluzia că stoechiometria fosforilării oxidative(raportul P/O) este maximal 3; 2; și 1 cu substrate NADH dependente, succinat și respectiv ferocitocrom c.

In legătură cu metabolismul energetic al mitocondriilor, un număr de lucrări excelente au sintetizat o bogată activitate experimentală desfășurată în acest domeniu.[537,538,539,540] Procesul de fosforilare oxidativă este esențial în transformarea energiei oxido reducătoare din lanțul respirator în gruparea macroergică

a ATP.[541,542]

Mecanismul molecular şi principiul acestui proces este încă necunoscut. Este în general acceptat astăzi faptul că enzima fosforilantă terminală a fosforilării oxidative este identică cu factorul F_1 descris de Pullman[543] şi Racker.[544] Pentru combinarea F_1 cu membrana mitocondrială internă sînt necesari alţi doi factori: unul[545] descris sub denumirea de factorul X; iar altul[546] descris sub denumirea de factorul CF_o.

Un preparat corespunzînd unui complex F_1 - X - CF_o este cunoscut sub denumirea de complex ATP-azic oligomicină sensibil.[547] Mecanismul în care energia oxido reducerii este transferată la sistemul F_1 - X - CF_o pentru sinteza de ATP reprezintă una dintre cele mai interesante probleme ale bioenergeticii.

Mitocondria are capacitatea să transforme energia oxido reducătoare direct în energia osmotică a acumulării de ioni fără participarea ATP şi deasemeni poate transforma energia ATP în energie osmotică fără implicarea lanţului respirator.[538,548] De fapt procesul de transport ionic mitocondrial este intim legat de mecanismul de fosforilare oxidativă, concepţie dezvoltată deosebit de rapid mai ales după lansarea teoriei chemiosmotice a procesului de fosforilare oxidativă de către Mitchell[549] în 1961.

Transferul de electroni în lanţul respirator reprezintă un proces care este organizat pentru a asi-

gura un transfer de energie. In legătură cu procesul de fosforilare oxidativă sînt cunoscute cîteva ipoteze principale ca:

- ipoteza chimică
- ipoteza chemiosmotică
- ipoteza conformaţională
- ipoteza protonilor localizaţi

Ipoteza chimică a procesului de fosforilare oxidativă are ca model mecanismul enzimatic al oxido-reducerii conservatoare de energie catalizată de glicerinaldehidă 3 fosfat dehidrogenaza în glicoliză şi se bazează pe concepţia transferului de energie printr-o serie de reacţii consecutive avînd intermediari chimici comuni ce posedă legături macroergice.

Prin această ipoteză se consideră că transferul a doi echivalenţi reduşi de la un transportor al catenei respiratorii la altul din imediata apropiere duce la formarea unui derivat primar "bogat în energie" a unuia dintre transportori. Acesta ulterior reactionează cu ADP şi P_a (pe o cale cu intermediari suplimentari) pentru a forma ATP.

Ideia de bază a acestei ipoteze este cuplarea chimică a două reacţii şi anume a unei reacţii de oxido reducere şi a unei reacţii de fosforilare.

Baza pentru forma actuală a ipotezei chimice a procesului de fosforilare oxidativă a fost dată în 1953 de către Slater.(550)

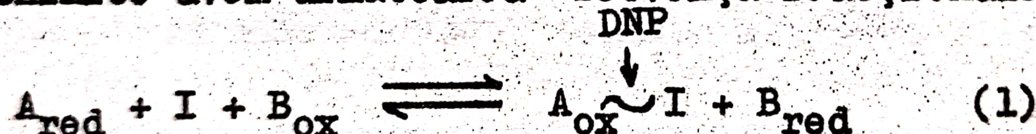
In formularea lui Slater se postulează exis-

tenţa unui intermediar bogat în energie,nefosforilat, înaintea introducerii fosfatului în secvenţa reacţională.

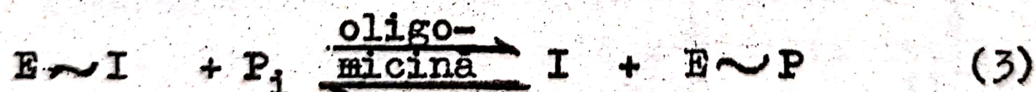
Prezenţa unei forme intermediare de energie în fosforilarea oxidativă care nu implică fosfatul şi care mediază energia şi spre alte funcţii dependente de energie ale mitocondriei a fost confirmată şi de Lee şi Ernster[551,552,553,554]

Natura acestei forme de energie şi mecanismul de formare a acesteia ca şi folosirea ei rămîn încă enigmatice.

Dacă se consideră A şi B drept transportori de electroni, I ca factor intermediar de cuplare şi E enzima generatoare de ATP, atunci conform ipotezei chimice avem următoarea secvenţă reacţională:









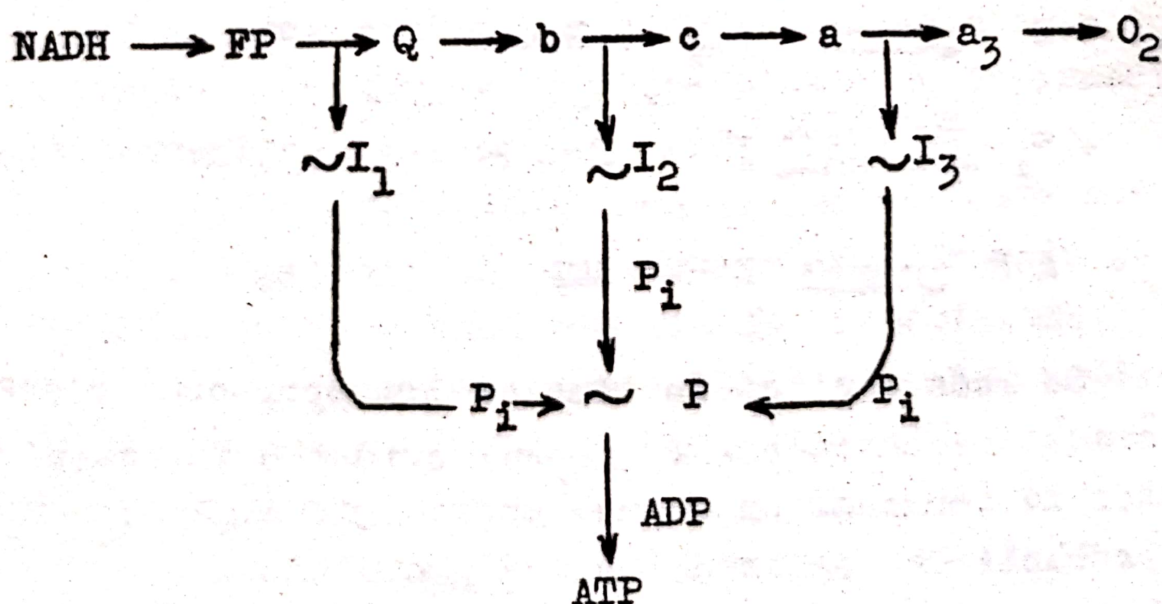
Se vede deci că în timp ce transportorul redus A este oxidat de către transportorul oxidat B în lanţul respirator se formează un compus macroergic $A_{ox}{\sim}I$, I este probabil un compus de natură proteinică.

Apoi A_{ox} este înlocuit cu E în formarea complexului E~I.

In următoarea reacţie intervine fosfatul anorganic pentru a forma complexul E~P (fosfoenzimă) care este donatorul direct de P pentru ADP în formarea de ATP. Oligomicina blochează formarea complexului E~P (fosfoenzimă) iar 2,4-dinitrofenolul (DNP) provoacă scindarea complexului A_{ox}~ I sau E~I cu regenerare de A_{ox} şi I sau de E şi I.

Activitatea ATP-azică este reprezentată de suma reacţiilor (4),(3) şi (2) urmată de acţiunea 2,4-dinitrofenol. Schimburile P_i-ATP şi ADP-ATP sînt probabil catalizate de reacţiile (2) la (4) şi de reacţia (4) respectiv.(555)

Mecanismul de fosforilare oxidativă este redat după teoria cuplării chimice conform schemei de mai jos:



Conform acestei scheme la fiecare loc de conservare de energie se genereează intermediari macroergici. O enzimă E este postulată în colectarea grupărilor fosfat macroergice din cele 3 loduri din lanţul respirator şi le donează apoi ADP cu formarea de ATP.

Teoria cuplării chimice a procesului de fosforilare a ADP cu procesul de oxidare a H^+ în lanţul respirator nu reuşeşte să demonstreze existenţa complexului $A_{ox} \sim I$ bogat în energie şi nici felul în care conform acestei teorii se poate justifica dependenţa de structura membranei mitocondriale interne a acestui proces. De asemeni această teorie nu explică fluxul de protoni şi alte mecanisme de transport din mitocondrii asociate respiraţiei celulare. De asemeni nici mecanismul decuplării fosforilării oxidative cu decuplanţi de tipul DNP nu este suficient de clar explicat.

<u>Ipoteza chemiosmotică</u>

Această ipoteză a fosforilării oxidative şi fotosintetică a fost dată de Mitchell în 1961 şi se bazează pe conceptul oxidoreducerii direcţionale cuplate cu reversibilitatea activităţii unei ATP-aze, anizotropic legată de membrană cu ajutorul unui gradient electrochimic de proteină transmembranar.[549] Ipoteza se bazează pe organizarea anizotropică a componentelor lanţului respirator într-o astfel de manieră încît respiraţia creiază un flux de protoni transmembranari.
Acest efect se realizează prin organizarea de transpor-

tori de hidrogen şi electroni intermitenţi în "noduri de legătură"[556,557] care corespund locurilor de cuplare din ipoteza chimică.

Mitchell[557] arată că obiectul ipotezei chemiosmotice este de a explica cuplarea dintre oxidoreducere şi fosforilare fără ca să asume existenţa unor intermediari chimici comuni pentru procesul de oxidoreducere şi de fosforilare.

Sistemul chemiosmotic constă din patru părţi de bază care corespund la patru postulate şi anume:

1. Un sistem ATP-azic , proton translocator.
2, Lanţul respirator proton translocator
3. Sistemul de difuzie şi schimb, care cuplează translocarea de protoni cu aceea de anioni şi cationi
.4. Membrana de cuplare ion-impermeabilă din care rezidă şi sistemele (1,2,3).

Ipoteza postulează existenţa a două sisteme ATP-azice reversibile denumite ATP-aza I şi ATP-aza II care pot transloca 1 şi respectiv 2 protoni pe mol de ATP hidrolizat.

Cel mai activ sistem ATP-azic în mitocondrii şi cloroplaste[557] este ATP-aza II.

După această teorie o ATP-ază reversibilă şi anizotropică localizată în membrana mitocondrială acceptă apa pentru hidroliza ATP, sub formă de protoni (nu însă hidroxili) de pe o suprafaţă a membranei şi hidroxili (nu însă protoni) de pe cealaltă suprafaţă a membranei.

Membrana conţine transportori care cuplează difuzia electroneutrală a H^+ cu difuzia cationilor şi difuzia OH^- cu difuzia anionilor. Prin aceste fapte, teoretic se poate cupla activitatea lanţului respirator cu sinteza de ATP pe calea unui gradient electrochimic de protoni ("forţă protonomotrice") fără implicarea unor intermediari macroergici primari. In acest mod ipoteza chemiosmotică, presupune o cuplare fizică între respiraţie şi fosforilarea oxidativă.

In analogie cu forţa electromotrice, forţa protonomotrice reprezintă deosebire în pH şi potenţialul de membrană determinată de activitatea ATP-azei translocatoare de protoni şi de activitatea lanţului oxidoreducător din membrană.

Cuplul dintre procesul de oxido-reducere şi fosforilare poate fi descris sub forma unui flux de protoni care leagă ATP-aza şi sistemul oxidoreducător la o forţă protonomotrice de circa 250 mV.

Deşi, ipoteza chemiosmotică pare să aibă mai mult suport experimental decît ipoteza chimică, totuşi aceasta conţine o serie de neclarităţi. Astfel, o transformare a energiei electrice în energie chimică aşa cum este postulată de Mitchell[558] nu a fost niciodată demonstrată pe sisteme model biologice.
Cea mai slabă parte a ipotezei lui Mitchell, constă în explicarea reversibilităţii activităţii ATP-azei. După această ipoteză ar rezulta că molecula de ATP-ază este specific şi deosebit de fin organizată în interiorul

membranei mitocondriale.

Prin ipoteza chemiosmotică, sistemul ATP-azic al mitocondriilor şi cloroplastelor, este cuplat cu sistemul oxidoreducător şi deci cu lanţul respirator, prin intermediul unui flux de protoni. După această teorie nu există nici un fel de legătură chimică între aceste două sisteme.

Ipoteza conformaţională

Incă în 1962 Margoliash(559) presupune posibilitatea existenţei unor modificări conformaţionale în structura proteinelor în timpul activităţii funcţionale a acestora.
King(560) remarcă diferenţe semnificative în proprietăţile optice ale formelor reduse şi oxidate ale unor preparate particulate de citocrom b - c_1 şi de succinat - citocrom c reductaza. El ajunge la concluzia că este foarte probabil că un transportor de electroni din lanţul respirator în stare redusă poate fi mult mai favorabil în ceea ce priveşte geometria sa spaţială pentru transferul de electroni la componenta următoare din lanţ. Favorabilitatea poate fi atribuită modificărilor din conformaţia proteinică, care plasează gruparea prostetică a componentei respective din lanţul respirator în imediata apropiere a partenerului următor din lanţul respirator.(561,562,563)
Astfel s-a arătat că în citocromul c, hemul este situat într-un spaţiu al proteinei mărginit de patru α- helixuri

paralele.

Se presupune că modificări conformaționale ale porțiunii proteice datorite oxidoreducerii pot aduce gruparea prostetică (hemul) a citocromului c într-o poziție favorabilă transferului de electroni. După această ipoteză, se presupune că structura lanțului respirator suferă modificări reversibile care sînt sincrone cu starea de oxidoreducere. Această ipoteză vine în contradicție cu ipoteze care văd în lanțul respirator o structură statică și rigidă.

Boyer[564] aseamănă modificările conformaționale din proteinele musculare induse de către hidroliza ATP, cu modificările proteinelor din lanțul respirator în timpul procesului de fosforilare oxidativă.
Se presupune că schimbări conformaționale în unele proteine (apoproteinele transportorilor de electroni) acompaniind oxidoreducerea pot reprezenta forța motrice a fosforilării oxidative.

O grupare carboxilică activată a fost postulată de Boyer[564] în calitate de intermediar bogat în energie format ca urmare a unor modificări conformaționale în transportorii din lanțul respirator.

Modificările redox induc modificări conformaționale în lanțul respirator [565] ca și în componenta proteinică a citocrom oxidazei.
S-au descris modificări în distribuția încărcăturilor electrice în membrana mitocondrială internă care însoțesc energizarea și de-energizarea, dar originea și natura acestor modificări este încă neclară.[568]

Perrniston[569] şi Hackenbroock[570] consideră modificările structurale observate în diferite stări energetice ale mitocondriilor, drept o indicaţie a unui mecanism conformaţional a procesului de fosforilare oxidativă.

Modificări în reacţia de oxidoreducere şi energetică din mitocondrii induc modificări conformaţionale în membrana acestora.[571]

Plasticitatea şi motilitatea structurală a proteinelor direcţionată conformaţional cu ajutorul efectorilor specifici, înlocuieşte azi vechea opinie care vedea în proteine, inclusiv în cele din lanţul respirator unităţi imobile, fixe, statice.

Controlul conformaţional este astăzi implicat în reglarea principalelor lanţuri metabolice, a unor enzime cu poziţie centrală în activitatea unui lanţ metabolic, cum sînt fosfo-fructokinaza din glicoliză, sau glutamat dehidrogenaza şi izocitricodehidrogenaza din metabolismul oxidativ. Studii de fluorescenţă au confirmat ipoteza participării active a mecanismelor de reglare conformaţională alosterică în sistemul transportor de energie, mitocondrial, în energizarea fragmentelor de membrană mitocondrială.

<u>Ipoteza "protonilor localizaţi"</u>

Principiul acestei ipoteze a fost postulat de Williams.[572,573] In general această ipoteză postulează ca rezultat al oxidoreducerii în lanţul respirator, eliberarea de protoni care rămîn fixaţi într-un anumit sec-

tor al membranei.
Protonii astfel localizaţi furnizează forţa motrice pentru sinteza de ATP prin diferite mecanisme, dintre care cel mai simplu pare a fi dehidratarea din apropierea centrului activ al ATP-azei cu formarea de H_3O^+ din apă, în echilibru cu ATP, ADP şi P-anorganic.(567)

Această ipoteză este în esenţă "chimică" dar diferă de diferitele variante ale ipotezei chimice, prin faptul că nu implică nici un fel de intermediari bogaţi în energie, iar parcursul oxigenului de la P-anorganic la apă în timpul fosforilării oxidative nu necesită implicarea de intermediari.

Ca şi în ipoteza chemiosmotică a lui Mitchell şi aci este punctată importanţa eliberării de protoni în timpul oxidoreducerii.

Williams(574) arată că protonii localizaţi anizotropic livrează energie fluxului dependent de energie al ionilor prin membrana mitocondrială, fără a implica aci în sensul adevărat aşa numitele "pompe ionice".

Mecanismul "protonilor localizaţi" nu implică modificări semnificative de pH în structura membranei, şi nu creiază un potenţial de membrană. In schimb, postulează aşa numitele potenţiale limită de difuzie de fiecare parte a membranei mitocondriale.
Această ipoteză depăşeşte unele molarităţi din ipotezele chimice şi chemiosmotice, în primul rînd prin faptul că presupune că protonii nu se deplasează în afara membranei pînă cînd nu s-a efectuat sinteza de ATP, ceea ce previne pierderi inutile de energie. De asemenea ipoteza

"protonilor localizați" nu implică o organizare deosebit de specifică a ATP-azei în membrană care este condiția esențială a teoriei chemiosmotice.

Din cele arătate pînă aci rezultă clar că între consumul de oxigen (respirație) și formarea de ATP, există o strînsă legătură. Această legătură demonstrează că respirația celulară este dependentă de prezența în mitocondrii a ADP și a fosforului anorganic și că deci consumul de oxigen este dependent și deci limitat de concentrația ADP și P-anorganic.

Respirația celulară este de asemeni dependentă de raportul NAD/$NADH_2$ sau FAD/$FADH_2$. Aplicînd legea maselor conform ecuației:

$$\frac{[NADH].[FAD].[ADP].[P]}{[NAD].[FADH_2].[ATP]} = K$$

vedem că respirația poate fi stimulată de exemplu, prin creșterea concentrației de ADP și P, efect observat cu deosebită claritate în activitatea musculară; și invers atunci cînd ATP este în exces, poate inhiba activitatea respiratorie.

O serie de date arată chiar, că la concentrații foarte mari de ATP, fluxul din lanțul respirator poate fi făcut reversibil.(reversibilitatea procesului de fosforilare oxidativă). Această autoreglare a lanțului respirator, poartă denumirea de "control respirator" reglat prin necesarul de energie.

Am văzut de asemeni că procesul de fosforilare

oxidativă reprezintă de fapt, un cuplu între procesul de fosforilare a ADP de către P-anorganic şi procesul de transfer de electroni de la donatori la acceptori în lanţul respirator. Această cuplare aşa cum am mai arătat, are loc la trei nivele şi anume:

- în timpul oxidării NADH,
- în timpul oxidării citocromului b,
- şi probabil în timpul oxidării citocromului c.

Astfel în cazul oxidării unui substrat în care acceptor primar de H^+ este NAD, deci care este oxidat de o NADH dehidrogenază, se formează trei molecule de ATP pentru fiecare atom de oxigen care este redus pentru a forma o moleculă de apă.
In cazul oxidării succinatului, cînd etapa NAD este omisă, se vor forma numai două molecule de ATP pentru fiecare atom de oxigen care este redus.

Oxidarea unei molecule de citocrom c duce la formarea unei molecule de ATP, formarea de ATP trebuind să aibă loc în etapa dintre citocromul c şi oxigen.

Experimental s-a putut demonstra că substratul este de asemeni factor limitant în procesul de fosforilare oxidativă. Astfel, dacă mitocondriile sînt păstrate în absenţă de substrat, toţi transportorii de electroni din lanţul respirator devin oxidaţi.
In timpul oxidării substratului şi a fosforilării cu care aceasta este cuplată, transportorii de electroni devin în stare redusă.

Pe baza datelor existente pînă în prezent, s-au putut stabili anumite raporturi stoichiometrice între diferiți transportori de electroni din lanțul respirator. Astfel s-a observat că citocromii și flavinele se găsesc în concentrații aproximativ egale, în timp ce piridin nucleotidele se găsesc în concentrații de circa 10 ori mai mari.

Din aceste date, ca și din diferite măsurători ale volumului mitocondrial, ca și a conținutului în proteine a mitocondriilor, s-a putut calcula numărul de ansambluri respiratorii pentru fiecare mitocondrie, și s-a putut aprecia că numărul acestora, deci numărul lanțurilor de transportori de electroni integrate, variază între 5000 și 10.000 pentru o mitocondrie.

Sintetizînd datele din literatură cu privire la procesul de fosforilare oxidativă, deci datele cuprinse în toate ipotezele cu privire la mecanismele de cuplare ale acestui proces, Loewy și Siekevitz,[575] prezintă o schemă pentru cuplarea transportului de electroni cu procesul de fosforilare.

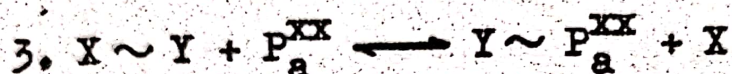
In schema care urmează apar următoarele notări:

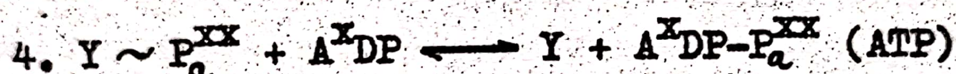
- A și B reprezintă transportorii de electroni
- X și Y sînt intermediari de cuplare ipotetici
- P_a reprezintă fosforul anorganic,
- P_a^{xx} este ^{32}P
- A^xDP este ADP radioactiv.

In această schemă se recunosc patru etape :


1. $AH_2 + B + X \longleftrightarrow A + BH_2 \sim X$


2. $BH_2 \sim X + Y \longleftrightarrow X \sim Y + BH_2$


3. $X \sim Y + P_a^{xx} \longleftrightarrow Y \sim P_a^{xx} + X$


4. $Y \sim P_a^{xx} + A^xDP \longleftrightarrow Y + A^xDP\text{-}P_a^{xx}$ (ATP)

Ideia centrală a acestei scheme, este că cuplarea dintre transportul de electroni și fosforilare cu care este asociat acest transport, are loc cu ajutorul unui intermediar, care este comun ambelor tipuri de reacție.

După această ipoteză se postulează că un transportor redus (AH_2) reacționează cu transportorul învecinat în lanțul respirator (B) în prezența unei alte substanțe (X), care reduce pe (B) la (BH_2). In acest timp, o legătură macroergică ($\sim$) se formează între BH_2 și X dînd($BH_2 \sim X$) cu o cantitate de energie înmagazinată egală cu aceea pe care o găsim în ATP. Acest compus în etapa următoare reacționează cu un nou compus ipotetic (Y), formînd un intermediar macroergic ($X \sim Y$). In etapa următoare P-anorganic intră în reacție, formînd ($Y \sim P$) și eliberîndu-l pe (X).
Complexul macroergic $Y \sim P_a$ se cuplează apoi cu ADP formînd în final ATP și eliberîndu-l pe (Y).
Complexul ($X \sim Y$) este în acest mod un intermediar comun

atît pentru transportorii de electroni cît și pentru enzimele de fosforilare.Se vede din schemă că toate etapele secvenței reacționale sînt reversibile.
Natura precisă a intermediarilor X și Y este necunoscută,s-ar putea să fie enzime fosforilate.S-a postulat ca în această schemă să intervină compuși ca " enzimă cu N activat legat" sau " enzimă cu histidină fosforilată legată".(575)
Nu se știe încă nici dacă compușii X și Y postulați în schemă pot fi aceeași în toate cele trei locuri de fosforilare din lanțul respirator.

Relații strînse există între procesul de fosforilare oxidativă și necesarul de energie al mitocondriei proprii pentru activitatea acestora.

Este de menționat că mitocondriile au un sistem activ de transport pentru diferiți ioni,deci ele necesită energie pentru acest transport.Formal,se consideră că ATP-ul generat în mitocondrii este singurul compus macroergic care este folosibil în transport.Totuși sînt date care arată că un intermediar macroergic pare să fie implicat aici,de natura compusului (X∽Y) din figura prezentată mai sus.
Se știe că transportul și acumularea de ioni ca Mg^{2+}, Ca^{2+}, sau K^{+} este însoțită de oxidare de substrate și de generare de ATP,sau necesită adăugarea de ATP ca atare.
S-a mai observat că dacă se adaugă oligomicină,adiționarea de ATP nu mai influențează transportul de ioni,

deşi oxidarea substratelor este blocată,deci în aceste condiţii transportul de ioni nu este afectat.
Dar întrucît se ştie că transportul de ioni necesită energie,este de presupus că în prezenţa oligomicinei, cînd nu se formează ATP,se poate forma totuşi un intermediar macroergic ca rezultat al oxidării substratului, şi se pare că acest intermediar este cel de tip (X∽Y) care poate fi făcut răspunzător şi pentru transportul de ioni şi acumularea acestora.De aici se poate deduce că pentru necesităţi energetice proprii (inclusiv transport) mitocondria foloseşte compusul (X∽Y),iar în condiţiile în care energia este livrată restului celulei,acest compus (X∽Y) poate fi fosforilat iar apoi folosit în generare de ATP.In acest mod ATP-ul este pus la dispoziţia celulei de către mitocondrie.
Pe baza acestei scheme s-ar putea explica şi efectul 2,4-dinitrofenolului.Acest compus a fost cunoscut o vreme îndelungată ca decuplant al procesului de fosforilare oxidativă,şi se ştie deci că în prezenţa unor concentraţii foarte mici ale acestui compus (10^{-4}- 10^{-5}M) în prezenţa de substrat şi ADP,respiraţia şi deci consumul de oxigen merge cu capacitate nemodificată sau chiar crescută, dar nu are loc nici un fel de fosforilare. 2,4 - dinitrofenolul este şi un activator al ATP-azei mitocondriale,hidrolizînd P-anorganic din ATP.
Toate aceste efecte ne fac să postulăm faptul că dinitrofenolul (DNP),acţionează cauzînd ruptura complexului

(X∽Y) şi deci eliberînd X şi Y, iar că în aceste condiţii (X∽Y) nu mai poate acţiona ca acceptor de P anorganic în formarea de ATP.

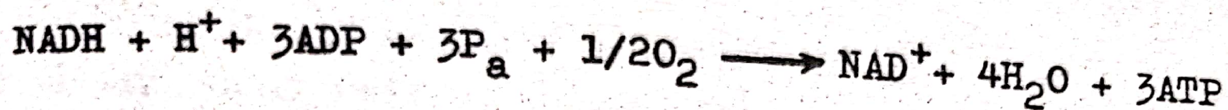
Oligomicina acţionează în etapa 3-a din schema de mai sus, în sensul că (X∽Y) care se formează ajută transportul de ioni, dar oligomicina blochează capacitatea de reacţie a acestui compus cu P anorganic şi deci blochează posibilitatea formării de ATP.[575]

Se postulează faptul că circa 90% din energia eliberată în timpul digerării substanţelor alimentare, are loc în procesul de transport de electroni.

Chance[576,577] Klingenberg[578] şi Andreoli [579] au stabilit posibilitatea existenţei unui transfer invers de electroni intramitocondrial şi care este dependent de energie.

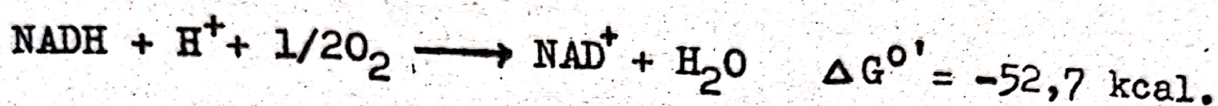
Law[580] demonstrează reducerea dependentă de ATP, a NAD în particulele submitocondriale fosforilante. Dacă aceasta este folosită împreună cu reacţia oxidativă generatoare de energie a NADH de către fumarat, o reducere rapidă a NAD este posibilă în prezenţa succinatului.

S-a izolat un factor de natură proteinică implicat în reducerea ATP-dependentă a NAD de către succinat în particulele submitocondriale.[579]
Factorul purificat este termolabil şi stimulează fosforilarea cuplată cu oxidarea succinatului sau a NADH ca şi schimbul ^{32}P-ATP, de asemeni are şi activitate ATP-azică. Reacţia generală a fosforilării oxidative poate fi scrisă sub forma:



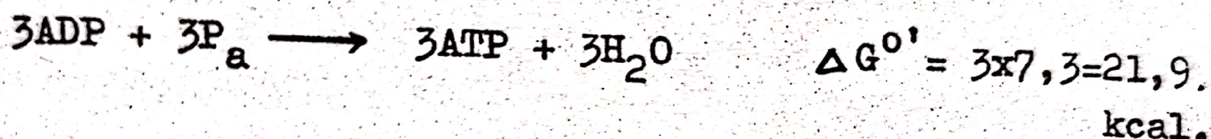
$$NADH + H^{+} + 3ADP + 3P_a + 1/2O_2 \longrightarrow NAD^{+} + 4H_2O + 3ATP$$

care poate fi despărţită în componenta exergonică:



$$NADH + H^{+} + 1/2O_2 \longrightarrow NAD^{+} + H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -52,7 \text{ kcal.}$$

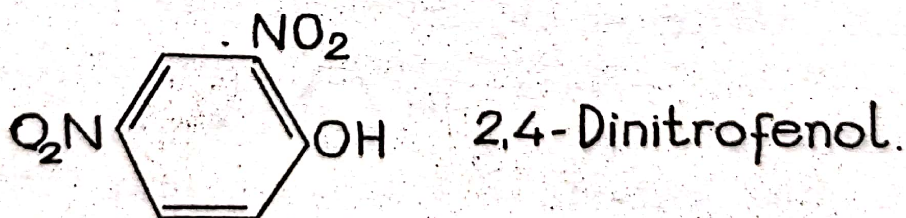
şi în componenta endergonică :



$$3ADP + 3P_a \longrightarrow 3ATP + 3H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = 3x7,3=21,9 \text{ kcal.}$$

Agenţi decuplanţi ai procesului de fosforilare oxidativă .

Loomis şi Lipmann(582) au observat că fosforilarea oxidativă poate fi disociată de respiraţie cu ajutorul unor agenţi chimici specifici ca 2,4 Dinitrofenolul şi alţi halo- şi nitrofenoli.



In prezenţa acestor agenţi respiraţia unui ţesut poate continua normal,sau poate fi chiar stimu-

lată ,dar aceasta în lipsa fosforilării ADP la ATP. Pentru acest motiv aceşti agenţi au fost denumiţi "agenţi decuplanţi".

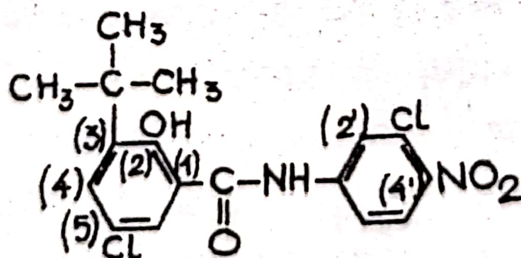
Se cunosc astăzi numeroase substanţe care au efect decuplant asupra fosforilării oxidative.Dintre aceştia amintim:



Dicumarol



Carbonilcianid p-trifloro-metoxifenilhidrazona.



5-cloro-3-butil-2'-cloro-4'-nitrosalicilanilida.

Marea majoritate a agenţilor decuplanţi sînt substanţe liposolubile ce conţin un ciclu aromatic şi o grupare acidă ionizabilă. Aceşti agenţi nu decuplează fosforilarea glicolitică şi nici alte reacţii.

Racker[583] consideră că 2,4-dinitrofenolul şi alţi agenţi decuplanţi disociază procesul de fosforilare de procesul de transfer de electroni.

Aşa cum am arătat mai înainte se postulează că agenţii decuplanţi se unesc cu compuşii intermediari bogaţi în energie ce se formează în timpul trecerii electronilor prin lanţul respirator, în vederea cuplării cu procesul de fosforilare a ADP de către P-anorganic a acestui proces.

Folosind decuplanţi ai procesului de fosforilare oxidativă, deci eliberînd transportul de electroni de sinteza de ATP, se pot studia capacităţile maximale ale enzimelor de dehidrogenare şi a celorlalte enzime din catena respiratorie şi de asemeni se poate aprecia rolul limitant al diferitelor substrate în determinarea capacităţii respiratorii celulare.[584,585,586]

Permeabilitatea membranei mitocondriale.Transportul de ioni dependent de respiraţia mitocondrială.

Membrana mitocondrială externă este relativ permeabilă pentru compuşii cu greutate moleculară mică iar membrana internă este permeabilă pentru apă, molecule neutre mici ca, ureea şi glicerolul, pentru acizi graşi cu catenă carbonică scurtă.

Membrana internă mitocondrială este considerată impermeabilă pentru cationii de Na^{+}, K^{+}, sau Mg^{2+} sau pentru anioni ca: Br^{-}, Cl^{-}, NO_3^{-}, zaharuri ca zaharoza și pentru mulți amino acizi. De asemeni membrana internă mitocondrială este impermeabilă pentru NAD și NADP, NADH și NADPH, pentru nucleozide-5-mono-,di-,și tri-fosfat și pentru CoA și esterii acesteia.

Compartimentul mitocondrial intern însă, conține un set complet din aceste nucleozide și coenzime care este fizic separat și funcțional este distinct de cele extramitocondriale sau citoplasmatice.

S-a demonstrat faptul că membrana internă mitocondrială conține o serie de permeaze sau transportori care efectuiază transportul unor metaboliți specifici prin membrană. Acești transportori se aseamănă intr-o oarecare măsură cu enzimele, în sensul că sînt specifici pentru anumite substanțe, au grade de saturație diferite în funcție de concentrația substanțelor de transport și pot fi inhibați specific.

In mitocondriile de ficat de șobolan s-au identificat transportori specifici pentru ADP și ATP, pentru fosfat și pentru unii intermediari ai ciclului Krebs, ai acizilor tricarboxilici.

Astfel transportul de ADP și ATP este inhibat specific cu Atractylozidă, transportul de fosfat este inhibat cu mersalyl, transportul de succinat sau de malat izocitrat, citrat și cis-aconitat este inhibat cu n-butilmalonat iar transportul de glutamat este inhibat cu

4-hidroxiglutamat.Se vede deci că transportul de ADP şi ATP prin membrana mitocondrială nu se face prin difuzie simplă ci cu ajutorul unor transportori specifici inhibaţi de atractylozidă-un glicozid toxic obţinut din plante mediteraniene-Atractylis gummifera-.

Ca şi oligomicina nici atractylozida nu inhibă fosforilarea oxidativă a ADP intramitocondrial,deşi sînt inhibitori ai procesului de fosforilare oxidativă inhibînd transportul ADP şi ATP de către un transportor special prin membrana mitocondrială.

Se pare că acest transportor din membrana mitocondrială permite intrarea unei molecule de ADP în mitocondrie numai în condiţiile în care o moleculă de ATP iese afară din această organită subcelulară.Acest schimb de moleculă pentru moleculă poartă denumirea de difuzie de schimb.

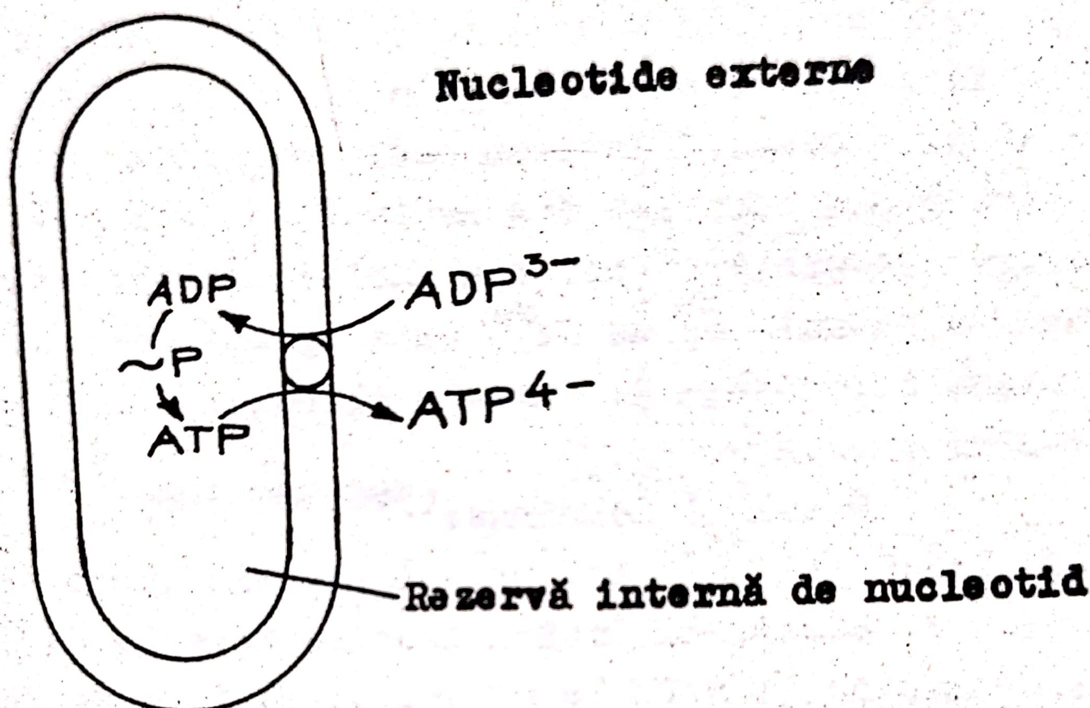
Transportul de ADP şi ATP din membrana mitocondrială este foarte specific şi nu poate transporta alţi XTP, sau XDP ca GDP,GTP,CDP,CTP etc.

Sistemele de transport al ionilor de fosfat şi al ionilor de hidroxil prin membrana internă este inhibat de către medicamentul mercurial-mersalyl.Sînt o serie de indicaţii care arată că transportorul de ADP şi transportorul de fosfat sînt legate funcţional.S-au identificat 2 transportori pentru intermediarii din ciclul Krebs. (587) Un transportor este specific pentru succinat şi pentru malat,iar cel de al doilea este specific pentru

citrat,cis-aconitat şi izocitrat.Acesta din urmă necesită prezenţa atît a ionilor de fosfat cît şi a malatului.Cei doi transportori inhibaţi de n-butilmalonat au fost identificaţi în mitocondriile de ficat şi de rinichi,dar nu au fost găsiţi în mitocondriile muşchilor aripilor de la insecte.

Aceste date demonstrează că fosforul anorganic şi ADP traversează membrana mitocondrială înaintea oxidării şi de asemeni se demonstrează că reacţiile ciclului Krebs ca şi transportul de electroni şi fosforilarea oxidativă au loc în compartimentul intern sau pe suprafaţa internă a membranei interne şi că ATP format în acest proces părăseşte apoi compartimentul intern pentru a ajunge în citoplasmă.
Conţinutul în ATP şi ADP intramitocondrial este separat de cel citoplasmatic,dar acestea comunică între ele.prin sistemul de transportori sensibili la atractylozidă.

Lehninger dă următoarea figură care explică schimbul de ADP şi ATP prin membrana mitocondrială internă prin mijlocirea transportului de ATP.
Transportorul este inhibat de concentraţii foarte mici de atractylozidă,compus ce se aseamănă structural cu ATP.

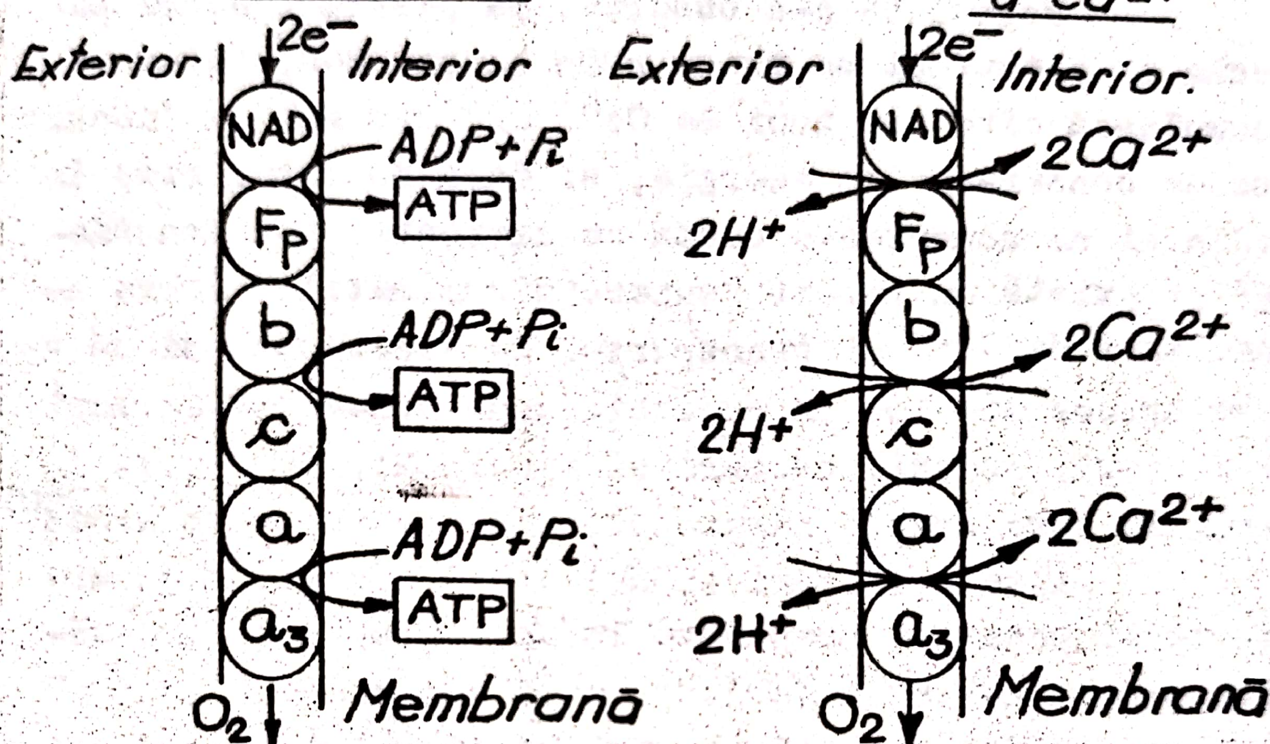


Există deci un schimb complex de intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici şi de fosfat între citoplasmă şi de compartimentul intramitocondrial. Această compartimentare a intermediarilor joacă un rol important în integrarea şi controlul metabolismului glicolitic şi respirator, ca şi în alte compartimente metabolice în care participă ciclul acizilor tricarboxilici şi în special în gluconeogeneză.

Mitocondriile intacte sînt capabile să acumuleze o serie de cationi bivalenţi din mediile în care sînt suspendate, în timpul respiraţiei. Dacă ionii de Ca^{2+} sînt adăugaţi la mitocondriile izolate, de rinichi de şobolan care respiră într-un mediu cu fosfat, Ca^{2+} este foarte rapid acumulat din mediu. Dacă la acest sistem se adaugă 2,4-dinitrofenol sau inhibitori respiratori ca cianura, acumularea de Ca^{2+} este pprită ceea ce demonstrează dependenţa de energia eliberată în respiraţie a acestui proces.

Rossi şi Lehninger(588,589,590) au arătat că acumularea de Ca^{2+} este stoechiometric legată de transportul de electroni. Pentru fiecare pereche de electroni care trec de la NADH la oxigen, cinci ioni de Ca^{2+} se acumulează din mediu, circa 1,7 pentru fiecare etapă conservatoare de energie. O dată cu acumularea de Ca^{2+} stoechiometric se acumulează şi P-anorganic. Deci ionii de Ca^{2+} şi fosfatul se acumulează în raportul în care aceştia sînt găsiţi în structura <u>hidroxiapatitei</u> sau a osului mineral.

Din figurile expuse în pagina următoare se vede modul în care fosforilarea ADP şi acumularea de cationi sînt procese alternative în timpul transportului de electroni.(590)



Lehninger(591) arată că dacă se acumulează Ca^{2+} în acest mod, fosforilarea oxidativă a ADP nu mai are loc. Acestea sînt procese alternative, iar energia rezultată din transportul de electroni poate fi folosită pentru acumularea de Ca^{2+} sau pentru formarea de ATP, dar nu pentru ambele procese simultan. Ionii de Sr^{2+} și de Mn^{2+} se acumulează într-o manieră asemănătoare cu acumularea Ca^{2+} în mitocondrie, nu însă ionii de Mg^{2+} care nu se acumulează și nu traversează membrana mitocondrială.

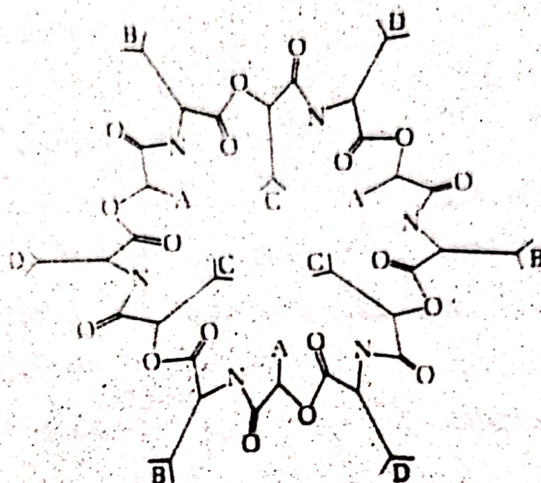
Capacitatea mitocondriilor de a acumula și de a elibera Ca^{2+} și fosfat poate fi asemănătoare funcției de calcifiere biologică, ca și sechestrării Ca^{2+} în timpul relaxării mușchilor roșii.

Faptul că s-a observat că pentru fiecare pereche de electroni ce trece prin lanțul respirator se acumulează cîte doi ioni de Ca^{2+}, Sr^{2+} sau Mn^{2+} la fiecare loc de conservare de energie, și dacă fosfatul este în mediu și se acumulează odată cu cationii, s-a considerat că există un raport "superstoichiometric" între acumularea de Ca^{2+} și transportul de electroni, și că acest proces are loc în prezența unor concentrații mari de cloruri, ioduri, bromuri și tiocianat, dar nu și în cazul în care aceste săruri sînt înlocuite cu zaharoză.[590]

Alte cercetări au arătat că adăugarea de mitocondrii proaspăt preparate la un mediu conținînd săruri nepermeabile ca NaCl, produce emiterea de ioni H^+ și alte modificări acido-bazice, modificări ce pot condiționa răspunsul mitocondrial la adăugarea de Ca^{2+}.

Cationii monovalenți de tipul K^+, cation ce se găsește în concentrație mai mare în citoplasma celulară, în mod normal nu se acumulează în mitocondrii întrucît membrana mitocondrială nu este permeabilă pentru K^+, Na^+, sau alți cationi monovalenți.
Totuși Pressman[592] găsește că o serie de substanțe care sînt cunoscute ca inhibitori sau cu efect decuplant în procesul de fosforilare oxidativă și în special antibioticele decuplante ca valinomycina și gramicydina, pot cauza acumularea de ioni de K^+ de către mitocondriile izolate.

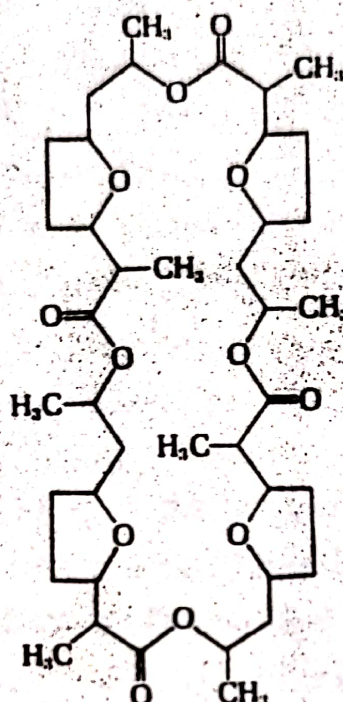
Dmoisu



A = L-Lactat
B = L-Valina
C = D-Hidroxiizovalerat
D = D-Valina

Cea mai mare parte din antibioticele ionofore care induc trecerea K^+ prin membrana mitocondrială au o structură circulară cu un centru gol care poate prinde K^+. Valinomicyna favorizează acumularea K^+, Rb^+, Cs^+, iar gramicydina favorizează atît acumularea de K^+ cît şi de Na^+, Li^+, Rb^+ şi Cs^+. Dacă K^+ este pompat în mitocondrii de către aceste antibiotice, mitocondria nu mai poate fosforila ADP.

Un alt antibiotic, şi anume nonactyna de asemeni induce penetrarea K^+ dar nu şi a Na^+ în mitocondrii. Acest antibiotic a fost recent cristalizat sub formă de sare de K^+.



Valinomicyna şi gramicydina sînt toxice pentru mitocondrii deoarece acestea determină mitocondria să folosească energia pe care normal o utilizează în fosforilarea oxidativă, pentru pomparea spre interior a K^+ care este urmată de efluxul pasiv şi rapid al acestui ion.

Acumularea de cationi bivalenţi de Ca^{2+}, Mn^{2+}, Sr^{2+} sau de cationi monovalenţi K^+, Na^+ (în prezenţă de gramicydină şi valinomicynă) are o proprietate semnificativă şi anume aceea că, în timp ce aceşti cationi se acumulează, un număr echivalent de ioni H^+ sînt emişi din

mitocondrii în mediu.

Transportul de electroni în direcţia naturală a fluxului din lanţul respirator,(593)(594) se pare că duce la emitere de H^+. Dacă în mediu se găseşte succinat şi respiraţia este blocată cu amital sau rotenonă,(595) atunci fluxul de electroni ia calea inversă şi H^+ sînt luaţi de către mitocondriile din mediu în timpul transportului de electroni, de la succinat la NAD.

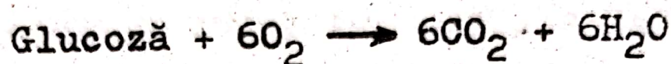
Efectul Pasteur şi efectul Crabtree.

Dacă o celulă care poate folosi facultativ glucoza atît aerob cît şi anaerob este obligată să folosească acest substrat în condiţii anaerobe, capacitatea acestei celule de a degrada glucoza şi de a forma acid lactic depăşeşte de multe ori aceeaşi capacitate pe care o au aceleaşi celule în condiţii aerobe.

Se ştie că glicoliza anaerobă are un bilanţ energetic de numai două molecule de ATP pentru o moleculă de glucoză metabolizată, în timp ce oxidarea totală a unei molecule de glucoză duce la formarea de 38 molecule de ATP.

Celulele facultative puse în condiţii de anaerobioză sînt obligate să consume cantităţi mari de glucoză. Dacă la o astfel de suspensie de celule este permis accesul oxigenului, cantitatea de glucoză folosită se reduce, consumul de oxigen începe imediat iar formarea de lactat scade foarte mult. In locul transformării

glucozei în două molecule de lactat, proces întîlnit în glicoliza anaerobă, în timpul respirației celulare oxidarea glucozei are loc după ecuația:



$$\text{Glucoză} + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

Acest fenomen de inhibare a cosumului de glucoză și de scădere a acumulării de lactat care este observat în timpul creșterii capacității respiratorii poartă denumirea de <u>efect Pasteur</u> .Acest efect a fost observat pentru prima oară de către Pasteur la celulele de drojdie și poate fi explicat prin faptul că în prezență de O_2 are loc o degradare totală a glucozei pînă la nivel de CO_2 și H_2O cu un bilanț energetic maximal pozitiv, care face ca aportul în energie dat de glicoliză să devină inutil.

Efectul Pasteur este o proprietate generală a tuturor celulelor facultative inclusiv a celulelor animale.

In glicoliza anaerobă, lactatul se formează din piruvat pe seama NADH generat în reacția gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza. Reacția formării de lactat este catalizată de lactat dehidrogenaza (LDH). Dacă această enzimă nu funcționează, NAD nu se regenerează iar glicoliza este blocată.

In condiții de aerobioză, NADH format în reacția glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenazei nu mai este oxidat în reacția LDH ci este oxidat prin lanțul respirator, care are o afinitate pentru NADH mai mare decît

LDH. Piruvatul în aceste condiții este oxidat direct la acetil CoA și CO_2.

Se știe că atît în respirație cît și în glicoliză ADP și P-anorganic sînt factori limitanți.
Efectul Pasteur și efectul Pasteur invers, denumit și efect Crabtree care de fapt este inhibiția respirației de către glicoliză pot fi explicate prin concurență pentru ADP și P-anorganic.
Efectul Crabtree a fost obsevat cel mai frecvent în celulele canceroase în care se știe că există o glicoliză crescută și o capacitate respiratorie scăzută.

Reglarea hormonală a respirației.

Respirația celulară este strîns legată de celelalte căi metabolice. Ea nu trebuie privită aparte de restul celulei, ca un sistem care într-un fel ar putea fi îngrădit și separat de restul mitocondriei sau celulei. Componente din toate compartimentele metabolice pot influiența respirația tisulară; iar procese diferite metabolice ca respirația și sinteza, inclusiv fotosinteza plantelor verzi folosesc adesea aceleași mijloace și reacții.

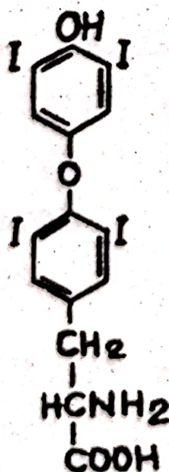
Respirația celulară așa cum am văzut, este reglată de cantitatea și calitatea enzimelor lanțului respirator, de integritatea membranelor mitocondriale în care acestea sînt localizate de capacitatea de sinteză a acestor enzime și de calitatea și cantitatea cofactorilor

necesari în activitatea lor.

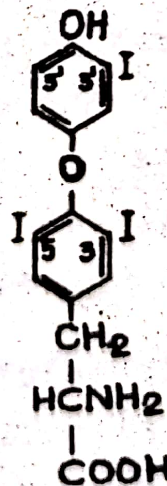
Respirația celulară este dependentă de aportul de substrate ce pot fi supuse reacțiilor de dehidrogenare. Respirația celulară este dependentă de raportul [ATP] / [ADP] [P_a]. De asemenea respirația celulară este reglată și de activitatea hormonală. Dacă glanda tiroidă la mamifere pierde total sau parțial capacitatea de a produce hormonii proprii (tiroxina și triiodotironina) consumul de oxigen scade semnificativ, iar activitatea metabolică generală marchează de asemeni o încetinire.

Hormoni tiroidieni

Tiroxina



3,5,3'-Triiodotironina.

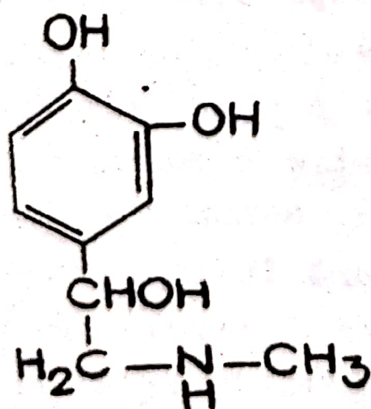


Dacă se administrează cantități mari din acești hormoni, metabolismul bazal crește și totodată crește și consumul de oxigen. O serie de cercetători au constatat că tiroxina stimulează consumul de oxigen decuplînd procesul de fosforilare oxidativă atunci cînd este adăugată la o suspensie de mitocondrii.

De asemeni există date care arată că tiroxina produce modificări în forma mitocondriilor - "swelling mitochondrial". Aceste modificări necesită cantități mari de hormoni.

Recent s-a observat că tiroxina induce o creștere a sintezei de flavoproteine mitocondriale și în special, o creștere a glicerol fosfat dehidrogenazei enzimă flavinică care participă în metabolismul glicerol fosfatului.

S-ar putea ca tiroxina să fie un inducător pentru sinteza enzimelor respiratorii din mitocondrii și în felul acesta să justifice **efectul stimulator al** creșterii capacității stimulatorii.



Adrenalina.

Adrenalina formată în celulele medulo-suprarenale transferată în ficat sau în celulele musculare cauzează o creștere a glicogenolizei stimulînd activitatea fosforilazei. Activarea fosforilazei de către adrenalină nu se face direct, ci stimulînd adenilciclaza care produce 3',5' - AMP ciclic din ATP.
AMP ciclic activează fosforilaz-kinază care transformă fosforilaza b în fosforilaza a activă.

Eliberarea glucozo-1-fosfat din glicogen, care rezultă ca urmare a efectului adrenalinei, crește pe de o parte respirația celulelor hepatice, iar pe de altă parte trecerea zahărului în circulația sanguină.

Ciclul acizilor tricarboxilici.

Cea mai mare parte a energiei obținute de celulele cu metabolism aerob, provine din respirație, deci din transferul de electroni de la moleculele substrat la O_2 molecular. Procesul de respirație celulară este un proces nou în scara evolutivă.

Cea mai mare parte a substratelor supuse oxidării în procesul de respirație celulară provine din ciclul acizilor tricarboxilici, denumit și "ciclul Krebs" etapă metabolică finală comună în care molecule din toate compartimentele metabolice (hidrați de carbon, acizi grași, amino acizi) sînt degradate final în procesul de catabolism.

In condiţii optime de aerobioză, catabolismul glicolitic al glucozei nu mai merge pînă la lactat ci numai pînă la piruvat. Chiar şi lactatul format anaerob în glicoliză, poate fi oxidat în condiţii aerobe, în mod deosebit de puternic în ficat şi în muşchiul cardiac, prin intermediul lactat dehidrogenazei din nou în piruvat, atunci cînd concentraţia de piruvat şi NADH este mică.

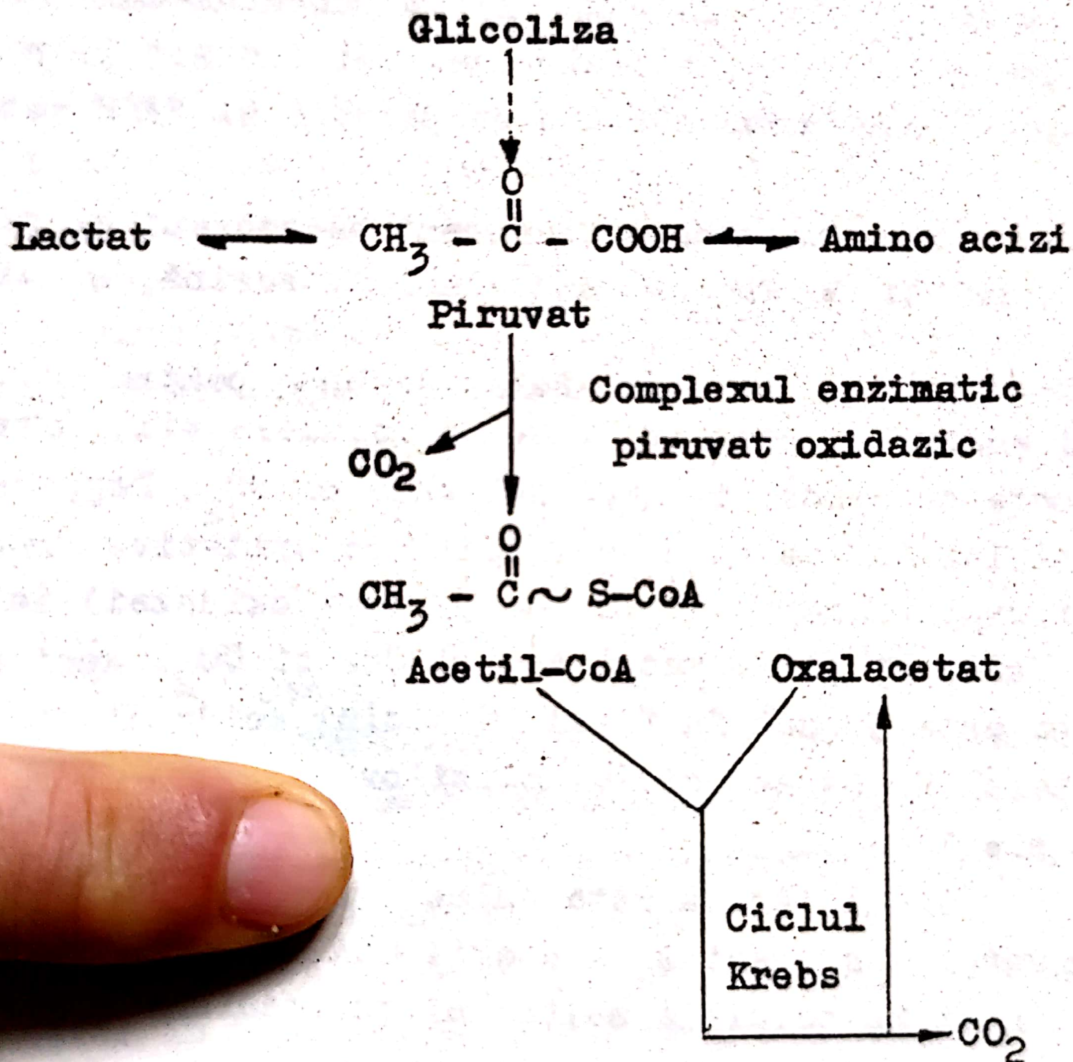
Piruvatul poate fi format de asemeni şi din amino acizi şi în special din alanină, serină, şi cisteină.

Intr-un lanţ metabolic de bază pentru metabolismul energetic prezent în toate celulele vii, piruvatul poate fi oxidat în trei molecule de CO_2. Degradarea piruvatului începe cu o decarboxilare oxidativă (reacţia piruvat dehidrogenazei sau piruvat oxidazei) în care din piruvat se formează acetil CoA şi CO_2. Apoi acetil CoA este oxidat în final în ciclul acidului citric sau ciclul Krebs sau ciclul acizilor tricarboxilici pînă la nivel de CO_2.

Ciclul Krebs este calea principală catabolică a piruvatului şi deci şi a acetil CoA în celula animală, vegetală şi în celulele multor microorganisme

Schema degradării finale

a piruvatului în Ciclul Krebs.



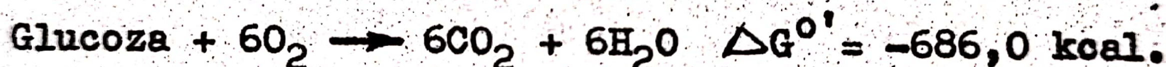
Din punct de vedere energetic respirația este un proces nou care apare la organismele superioare odată cu dezvoltarea aerobiozei pe planeta noastră.

Oxigenul a creiat respirația, înlocuind glicoliza comună organismelor inferioare, dar care persistă ca proces metabolic și la organismele superioare alături de respirația celulară.

Glicoliza este un proces metabolic în care este eliberată numai o parte din energia chimică presupusă prezentă în structura moleculei de glucoză. Mult mai multă energie se eliberează atunci cînd molecula de glucoză este oxidată complet pînă la CO_2 și H_2O așa cum se vede din compararea modificărilor de energie liberă standard obținută prin transformarea glucozei în lactat sau prin oxidarea glucozei în CO_2 și H_2O.



$$\text{Glucoza} \longrightarrow 2\ \text{lactat} \quad \Delta G^{o'} = -47,0\ \text{kcal.}$$



$$\text{Glucoza} + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \quad \Delta G^{o'} = -686,0\ \text{kcal.}$$

De aici se vede că celulele care au o viață anaerobă trebuie să consume mult mai multă glucoză decît cele aerobe, pentru a obține aceiași cantitate de energie.

Bioxidul de carbon, produsul final de oxidare al glucozei, este o moleculă mult mai simplă și mult mai mică decît glucoza, iar atomul de carbon al acestuia este total oxidat.

In cazul respirației celulare oxigenul molecular fiind acceptor de electroni, se cîștigă mai multă energie decît în glicoliză unde acceptor de electroni este piruvatul.

Ciclul Krebs furnizează hidrogen pentru oxidarea biologică şi în felul acesta este foarte strîns legat de metabolismul energetic celular.

Enzimele ciclului Krebs sînt situate în cea mai mare parte în mitocondrii.

Dispoziţia organizatorică intracelulară a respiraţiei.

Degradarea enzimatică a substanţelor nutritive din celulă şi anume, a hidraţilor de carbon, lipidelor şi proteinelor, are loc printr-un număr de reacţii enzimatice consecutive. Enzimele care catalizează aceste etape, şi diferiţii intermediari chimici formaţi în timpul degradării în etape a moleculelor nutritive sînt în cea mai mare parte cunoscute.

Catabolismul principalelor grupe de substanţe nutritive, aşa cum arată Lehninger, are loc în trei etape majore şi anume:

<u>In etapa I</u> moleculele de substanţe nutritive sînt degradate pînă la nivelul constituienţilor de bază. Astfel polizaharidele se degradează pînă la hexoze şi pentoze, proteinele se degradează în amino acizi, iar lipidele în acizi graşi, glicerol şi celelalte componente.

<u>In etapa II</u> diferitele produse de degradare obţinute in etapa I, sînt strînse la un loc şi transformate într-un număr redus de molecule simple. In acest mod, hexozele, pentozele şi glicerolul sînt degradate

pînă la nivel de glicerinaldehid 3-fosfat şi apoi pînă la acetil CoA.In acetil CoA de asemenea sînt degradaţi şi acizii graşi şi un număr important de amino acizi.

Amino acizii în acest stadiu de degradare,mai sînt transformaţi şi în α-cetoglutarat,succinat,oxal-acetat.

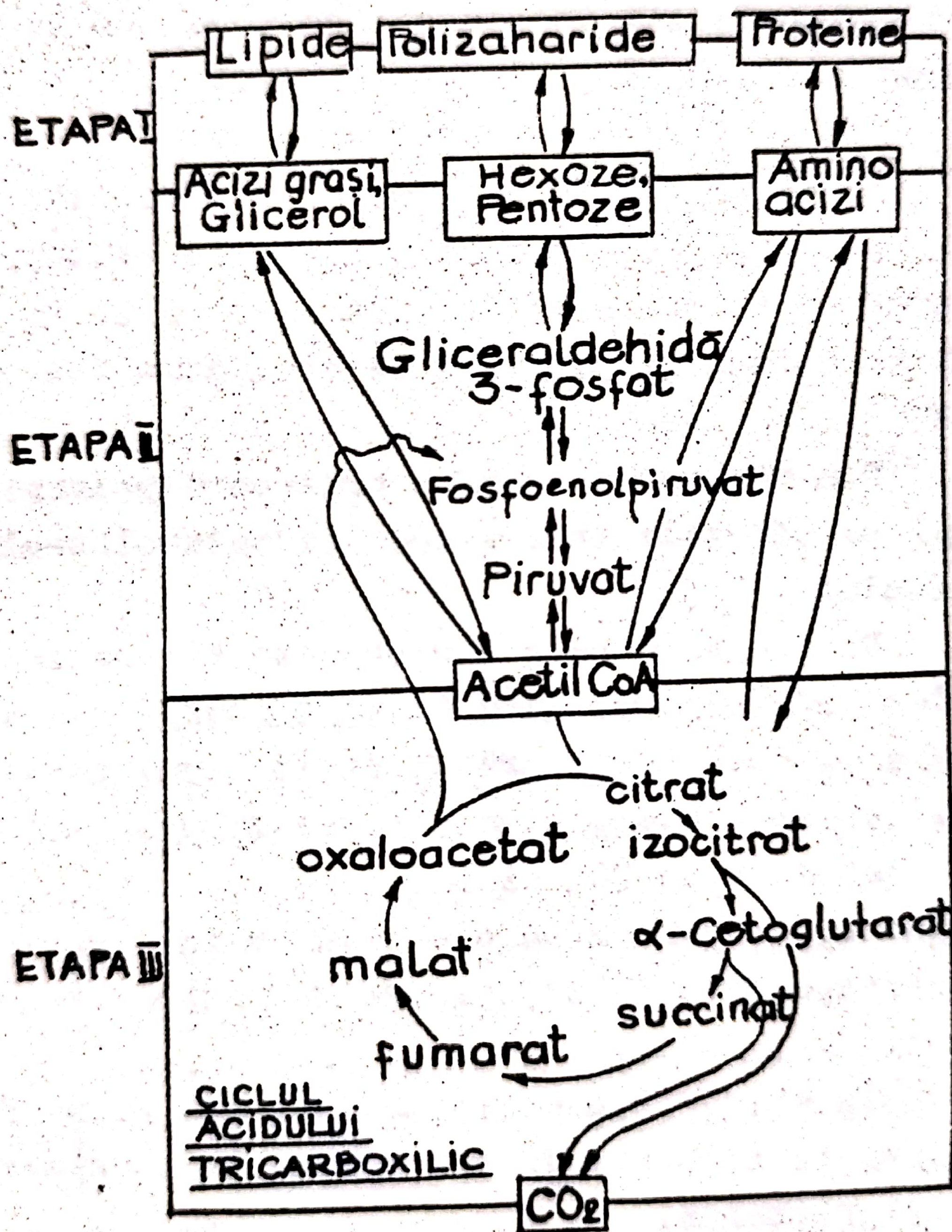
In etapa III în care are loc metabolismul final al scheletului carbonic al tuturor constituienţilor nutriţienali prin oxidarea lor finală pînă la CO_2 şi H_2O sînt introduşi şi produşii de degradare formaţi în etapa II.

Din figura din pagina următoare prezentată de Lehninger se văd cele trei etape ale catabolismului şi anabolismului.

După cum se vede din această figură,anabolismul se desfăşoară parcurgînd în sens invers aceleaşi trei etape pe care le-am arătat şi în cazul catabolismului.Astfel,spre exemplu,se ştie că sinteza amino acizilor porneşte de la CO_2 şi NH_3.
Primele schelete carbonice ale amino acizilor,sînt ceto acizii corespunzători lor,care se sintetizează în etapa III.

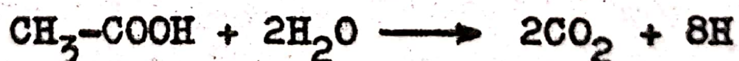
In etapa II aceştia se aminează şi se formează α - amino acizii care în etapa I se polimerizează în peptide şi proteine.

Din schema redată anterior, se vede că ciclul Krebs reprezintă etapa finală de metabolizare a scheletului carbonic ai tuturor constituienţilor organici naturali din celulă.


Lipide
Polizaharide
Proteine
ETAPA I
Acizi grasi, Glicerol
Hexoze, Pentoze
Amino acizi
Gliceraldehidă 3-fosfat
ETAPA II
Fosfoenolpiruvat
Piruvat
Acetil CoA
citrat
izocitrat
oxaloacetat
α-Cetoglutarat
ETAPA III
malat
succinat
fumarat
CICLUL ACIDULUI TRICARBOXILIC
CO_2

Acetil CoA produs în etapa II a catabolismului este mai departe metabolizat în etapa III, deci în ciclul acizilor tricarboxilici, care reprezintă așa cum s-a mai arătat, etapa oxidativă comună catabolismului tuturor moleculelor combustibile din celulele aerobe. In acest ciclu restul de acetat este descompus cu formarea de CO_2 și atomi de hidrogen. Atomii de hidrogen sau mai bine zis echivalenții electronici ai acestuia sînt apoi oxidați în catena respiratorie așa cum am văzut, după transportarea lor prin cîteva etape de către transportori specifici. Acest proces de transport de electroni spre oxigen, are loc cu o mare pierdere de energie liberă, din care cea mai mare parte se conservă sub formă de ATP în procesul de fosforilare oxidativă a ADP cu car care este cuplat transportul de electroni.

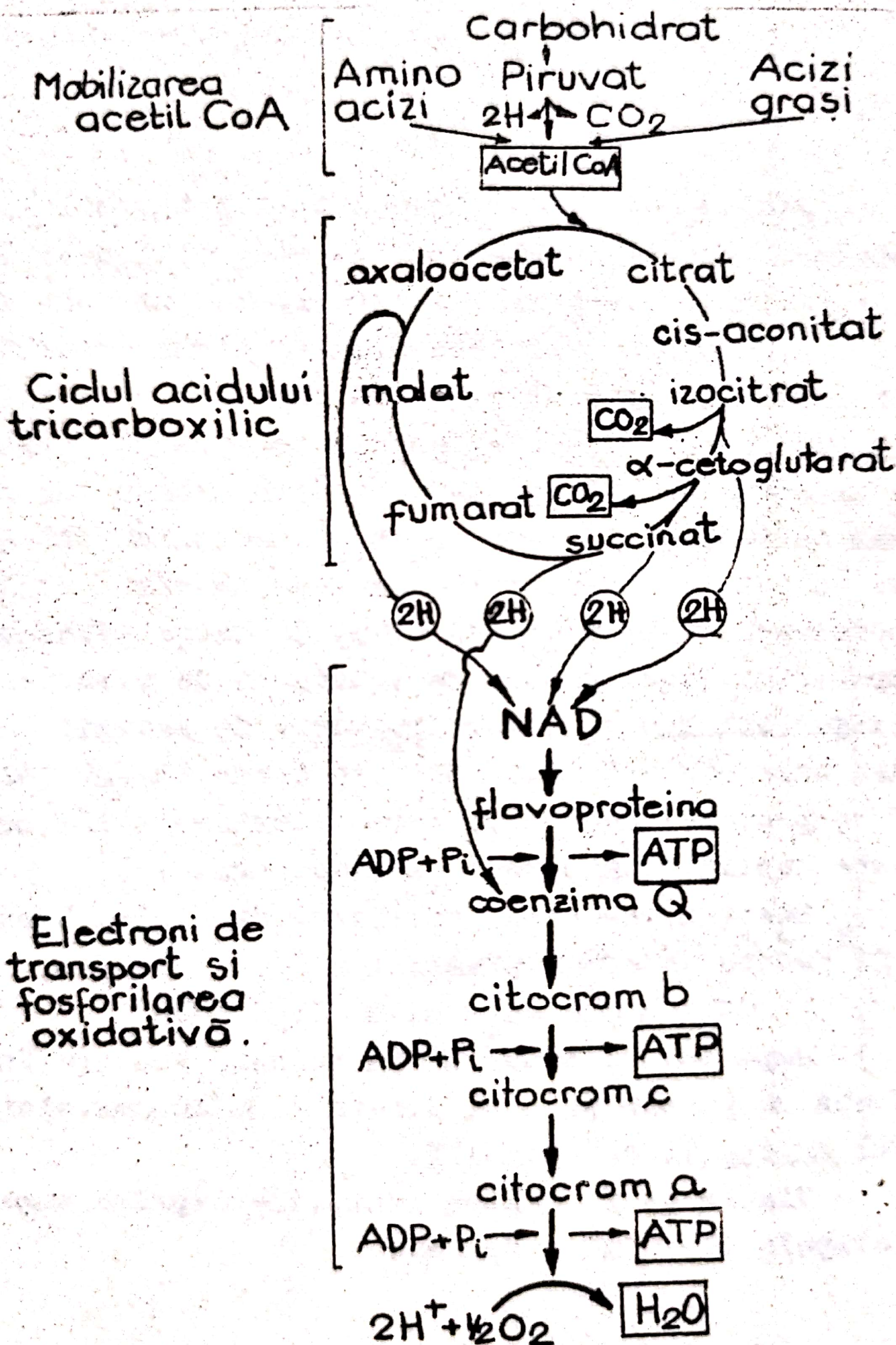
Reacția generală catalizată de ciclul Krebs poate fi redată în modul următor:



$$CH_3-COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 8H$$

După cum se remarcă din această ecuație, în ciclul Krebs nu participă nici oxigenul molecular, nici fosforul anorganic și nici ATP.

Figura de pe pagina următoare exprimă sugestiv toate etapele fluxului respirator.


Mobilizarea
acetil CoA
Carbohidrat
Piruvat
Amino
acizi
2H
CO_2
Acizi
grași
Acetil CoA
Ciclul acidului
tricarboxilic
axaloacetat
citrat
cis-aconitat
malat
izocitrat
CO_2
α-cetoglutarat
fumarat
CO_2
succinat
2H
2H
2H
2H
NAD
flavoproteina
ADP+Pi
ATP
coenzima Q
Electroni de
transport si
fosforilarea
oxidativă.
citocrom b
ADP+Pi
ATP
citocrom c
citocrom a
ADP+Pi
ATP
$2H^+ + ½O_2$
H_2O

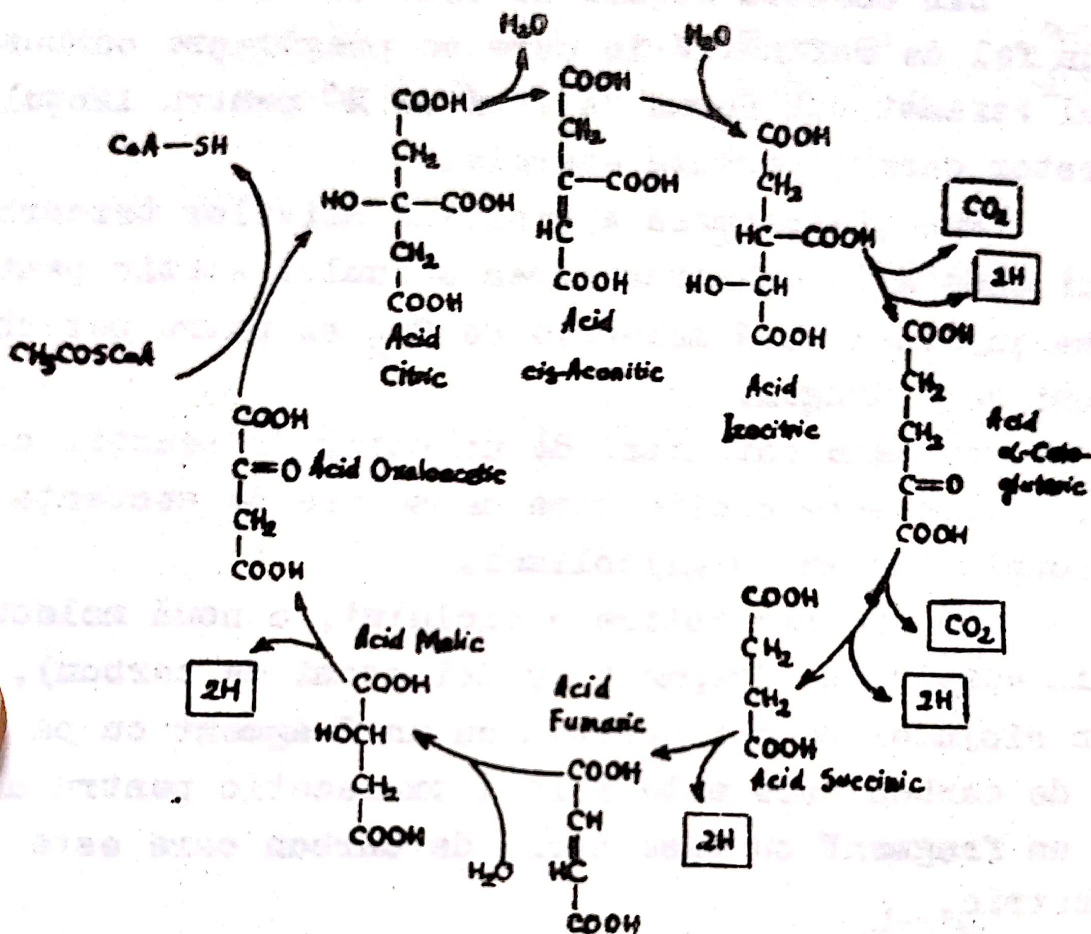
Din această figură se vede că ciclul Krebs este un fel de rafinărie în care se pregătește combustibilul rafinat sub formă de ioni de H^+ pentru lanțul respirator care generează energie.

Funcția primară a ciclului acizilor tricarboxilici constă în dehidrogenarea acidului acetic pentru a forma în final două molecule de CO_2 și patru perechi de atomi de hidrogen.
Acest proces este catalizat de un număr de reacții consecutive care este ciclic spre deosebire de secvența reacțională liniară a glicolizei.

La fiecare rotire a ciclului, o nouă moleculă de acid acetic (un fragment cu doi atomi de carbon), intră în ciclu și se condensează cu un fragment cu patru atomi de carbon care este acidul oxalacetic pentru a forma un fragment cu șase atomi de carbon care este acidul citric.

Deci, în sinteza acidului citric este vorba de o reacție de adiție a unui acid 2-C-monocarboxilic (restul de acetil) la un acid 4-C-dicarboxilic (oxalacetat) printr-o legătură carbon-carbon cu formarea unui acid tricarboxilic care este acidul citric.

Ulterior acidul citric este degradat cu formare de două molecule de CO_2 iar în procesul de regenerare a oxalacetatului pentru o nouă condensare cu acetatul și deci pentru începerea unui nou ciclu, au loc patru dehidrogenări. De aici se poate deduce că oxalacetatul nu se consumă în timpul activității ciclului.



– Se poate considera deci, că o moleculă de oxalacetat este suficientă pentru a oxida un număr infinit de molecule de acetat, deci o moleculă de oxalacetat catalizează oxidarea unui număr mare de molecule de acetat.

Pe de altă parte din această secvență reacțională, s-ar putea deduce și experimental că în respirația reticulocitară, oxalacetatul este un factor limitant atît în ciclul Krebs cît și în respirația celulară.(596)

Localizarea intracelulară a enzimelor ciclului Krebs.

Mitocondriile de ficat de şobolan suspendate într-un mediu tamponat ce conţine fosfat, adenin nucleotide şi Mg^{2+} catalizează oxidarea piruvatului şi a intermediarilor ciclului acizilor tricarboxilici, cu ajutorul oxigenului molecular.

Capacitatea de oxidare a piruvatului pentru mitocondriile izolate din ficat, corespunde capacităţii respiratorii a ficatului intact.

Experimental s-a demonstrat că nucleii, microzomii şi citoplasma celulară, sînt practic inactivi în procesul de respiraţie celulară.

Intrucît pentru respiraţie mitocondriile necesită adăugarea numai a adenin nucleotidelor şi Mg^{2+} s-a dedus de aici că enzimele ciclului Krebs şi ale lanţului transportor de electroni, sînt încorporate în structura mitocondriilor.

S-a demonstrat, că mitocondriile izolate din diferite ţesuturi animale şi vegetale, protozoare şi alte microorganisme, pot efectua oxidările pentru toate substratele ciclului acizilor tricarboxilici.

O parte dintre enzimele acestui ciclu, au fost găsite şi în citoplasma extramitocondrială, în special, malat dehidrogenaza, aconitaza, şi fumaraza. Aceste enzime extramitocondriale au funcţii în alte căi metabolice.

Reacțiile enzimatice ale ciclului acizilor tricarboxilici, au loc în compartimentul intern al mitocondriei. O serie de enzime ale ciclului Krebs, sînt puternic legate de membrana mitocondrială și de aceea greu de extras în formă solubilă. Izolarea, purificarea, și caracterizarea activității acestor enzime este mult mai dificilă decît pentru enzimele glicolitice care pot fi extrase cu ușurință în formă solubilă.

Secvența reacțională în "Ciclul Krebs".

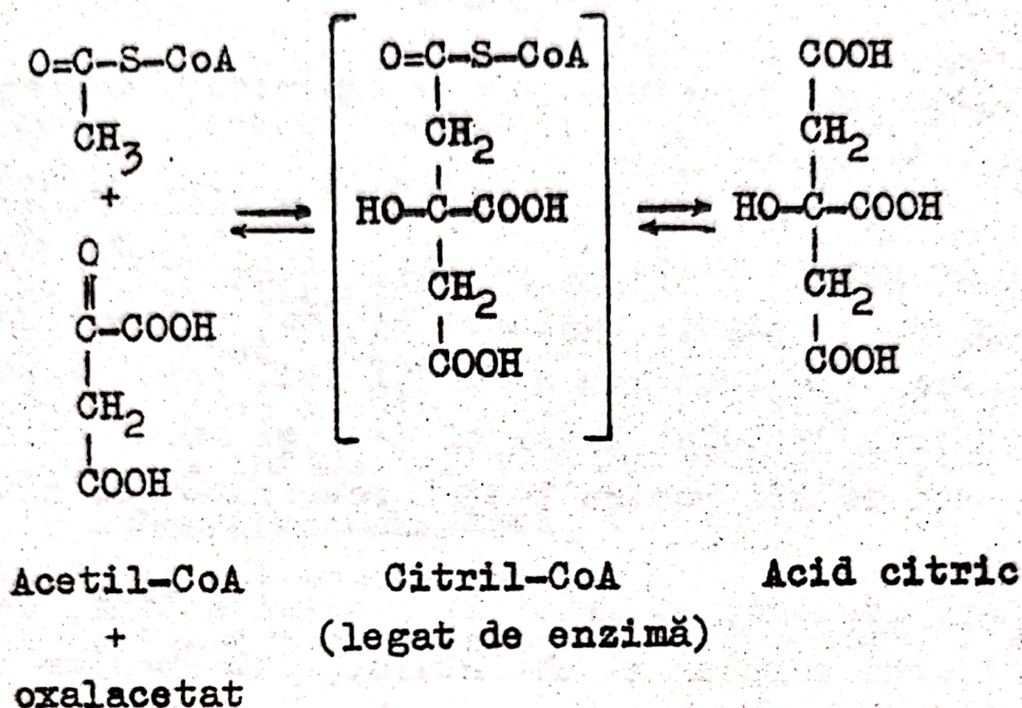
Pentru prima dată scheletul ciclului acizilor tricarboxilici a fost postulat de către Krebs în 1937. Pornindu-se de la acest schelet, s-au purificat enzimele și s-au stabilit reacțiile individuale, constituente ale ciclului.

Așa cum am văzut din schemele prezentate mai sus, reacția de inițiere a ciclului acizilor tricarboxilici este reacția citrat sintetazei.

Citrat sintetaza.

Condensarea acetil CoA cu oxalacetatul pentru a forma citratul, este catalizată de citrat sintetaza, denumită și enzima de condensare.

Citrat sintetaza a fost obținută în stare cristalină.(597)(598) In reacția catalizată de această enzimă restul de metil a acetil CoA se condensează cu atomul de carbon carbonilic al oxalacetatului după ecuația, reprezentată pe pagina care urmează.



Se vede că în reacţie condensarea acetil CoA cu oxalacetatul duce la formarea într-o primă fază de citril CoA. Apoi, legătura tioesterică se rupe cu eliberarea de acid citric şi coenzima A. Reacţia se dezvoltă în direcţia formării de citrat din cauza hidrolizei exergonice a legăturii macroergice tioesterice ($\Delta G^{o'}$= -7,7kcal.) Citrat sintetaza catalizează şi formarea monofluorocitratului din monofluoracetil CoA şi oxalacetat. Monofluorocitratul este un inhibitor puternic al aconitazei enzima următoare din ciclul acizilor tricarboxilici.

Citrat sintetaza este o enzimă limitantă în ciclul Krebs. Este puternic inhibată de ATP în multe organisme şi de NADH în E.coli.(599)

Reglarea activităţii citrat sintetazei la ni-

vel celular sau subcelular are o importanţă deosebită din punct de vedere fiziologic.

Determinînd etapa iniţială a ciclului acidului citric pentru oxidarea acetil CoA provenită din piruvat sau acizi graşi, reglarea acestei enzime poate determina soarta metabolică a acetil CoA, capacitatea funcţională a ciclului Krebs şi deci şi furnizarea de echivalenţi reduşi pentru lanţul respirator şi sinteza de ATP.

De asemeni reglarea activităţii acestei enzime, controlează nivelul celular al citratului, intermediar metabolic implicat în controlul activităţii pentru cel puţin două enzime citoplasmatice şi anume, pentru activitatea acetil CoA carboxilazei, enzimă ce iniţiază procesul de biosinteză al acizilor graşi şi care este activată de citrat,(600) şi pentru activitatea fosfofructokinazei, enzimă limitantă din glicoliză, care este puternic inhibată de citrat.(601,602)

Citratul este de asemeni descris ca sursă de resturi de acetil şi echivalenţi reducători pentru sinteza de acizi graşi în citoplasmă.(603,604)

Există date care arată că enzima este reglată cu o serie de inhibitori alosterici. Dintre compuşii descrişi ca inhibitori ai enzimei, citām adenin nucleotide ca: ATP, ADP, şi AMP(597,598,605) şi NADH(599,606) dintre piridin nucleotidele reduse.

Enzima mai este inhibată de acizi graşi cu catenă carbonică lungă(607) şi de către α-cetoglutarat.(608)

Atkinson şi Goodwin(609) enunţă aşa numita "ipoteză a controlului cu adenilaţi" a citrat sintetazei, demonstrînd inhibiţia acestei enzime cu concentraţii fiziologice de ATP, ADP şi AMP. Aceşti autori demonstrează dependenţa metabolismului carbonului din mitocondrii şi celulă de raportul (ATP + 1/2 ADP)(ATP + ADP + AMP). Această reglare cu adenin nucleotide a ciclului Krebs, se poate datora influenţei ATP, ADP şi AMP asupra:

- fosfofructokinazei,
- citrat sintetazei şi
- izocitrat dehidrogenazei NAD specifice

Cînd în celulă concentraţia de ATP este mare iar concentraţia de ADP şi AMP este mică, metabolismul carbonului este redus datorită inhibiţiei cu ATP a celor trei enzime arătate mai sus.

Dacă ATP este în concentraţie mică iar ADP şi AMP sînt în concentraţie mare, nivelul de activitate al celor trei enzime creşte puternic.

Reglarea citrat sintetazei cu adenin nucleotide se complică mult după ce o serie de autori observă că inhibţia enzimei cu ATP este reversibilă la adăugarea de Mg^{2+} (605,610,611)

Se presupune că cea mai mare parte a ATP din ţesuturi se găseşte sub formă de $(ATP\text{-}Mg)^{-2}$-chelat. O concentraţie de ATP de 4 µmoli/g greutate umedă şi o concentraţie de Mg^{2+} de 10 µmoli/g greutate umedă ca aceea găsită în ficat, este practic suficientă pentru a face ca ATP liber să poată inhiba citrat sintetaza.

Inhibiția citrat sintetazei cu acizi grași-CoA cu catenă carbonică lungă, ca de ex. palmitil-CoA, este nespecifică și poate fi evitată prin creșterea concentrației de proteine din mediu.[612,613]

Așa cum s-a mai arătat oxalacetatul este limitant în formarea de citrat.[584,585,586,614] Așa cum s-a demonstrat[605] K_m pentru oxalacetat al citrat sintetazei este de 2 - 5 μM, iar concentrația intracelulară de oxalacetat în ficatul intact[615] este de numai 0,1-0,4 μM, deci mult mai mică decît K_m enzimei pentru substrat. In aceste situații, modificări mici în concentrația de oxalacetat pot influența mult sinteza de citrat.

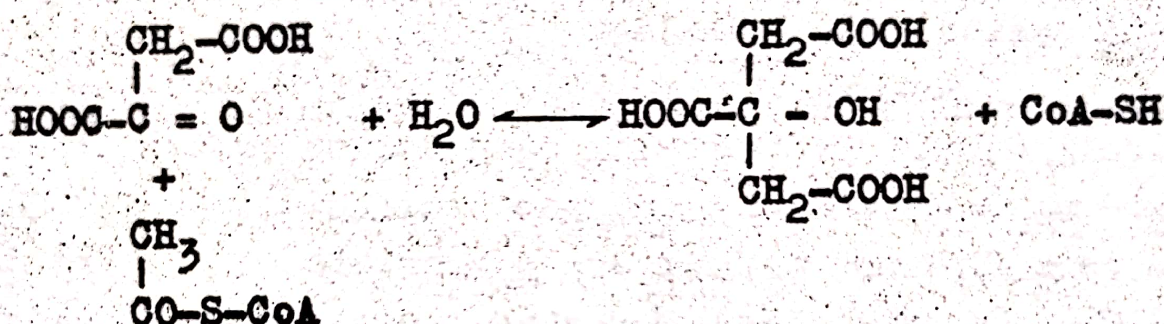
Garland[616,617,618] a studiat sinteza de citrat și controlul acesteia cu adenin nucleotide și observă că în mitocondriile decuplate cu puțin ATP, sintetizează primar citrat, în schimb mitocondriile cuplate cu mult ATP sintetizează primar acetoacetat și foarte puțin citrat. Se pare că cel mai important element în sinteza de citrat rămîne aportul de oxalacetat și acetil CoA, iar efectul adenin nucleotidelor și al NADH trebuie văzut la acest nivel și nu direct la nivelul citrat sintetazei ca atare.

Sinteza de acetil CoA din piruvat ca sursă principală, s-a descris la Capitolul Vitamina B_1 și la Acidul Pantotenic din prima parte a cursului nostru.[619,620]

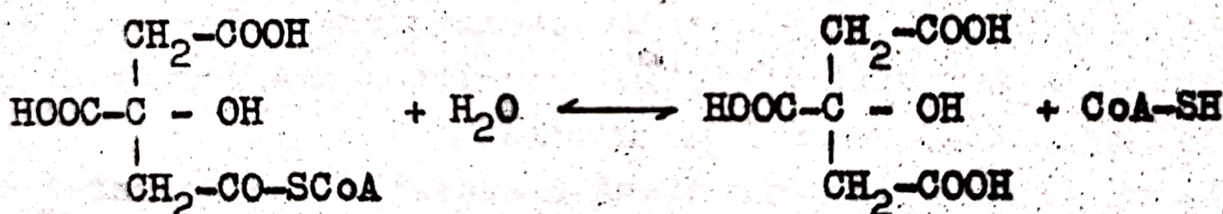
Studiind activitatea citrat sintetazei[621] din inimă de porc, s-a constatat că această enzimă catalizează trei tipuri de reacții și anume:

- activitate liazică
- activitate hidrolazică
- activitate enolazică.

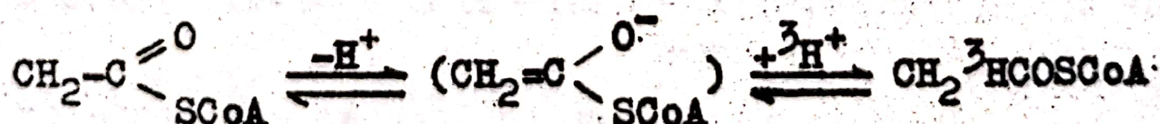
Activitatea liazică este redată de acuaţia:



Activitatea hidrolazică este redată de ecuaţia care arată hidroliza S-citril-CoA :



Iar activitatea enolazică este redată de ecuaţia de încorporare a tritiului deci apă cu tritium, în acetil CoA. Această reacţie necesită malat ca inductor



Citrat sintetaza şi malat sintetaza catalizează acelaş tip de condensare a unui oxoacid cu acetil

CoA şi are loc în acelaşi tip de reacţie stereochimică. Diferenţa constă pe de o parte în necesarul de cofactori şi anume, malat sintetaza necesită pe lîngă acetil CoA şi glioxilat şi ioni de Mg^{2+} pe cînd citrat sintetaza, enzimă ce catalizează cele trei reacţii arătate mai sus nu necesită ioni acetilici.

Wright[(673)] purificînd citrat sintetaza din E.coli ajunge la concluzia că proteina activă catalitic este un tetramer cu o greutate moleculară de 248.000 în care fiecare monomer are o greutate moleculară de 62.000. La pH 8,0 - 9,5 citrat sintetaza în concentraţii mari sau diluată, se prezintă într-o mixtură în echilibru în care pe lîngă tetrameri activi catalitic, găsim octameri şi structuri monomerice.

La pH 7,0 echilibrul se deplasează înspre formare de octameri iar ditiotreitolul condiţionează formarea numai a acestei specii de octameri.

La pH 11,0 enzima disociază ireversibil cu formarea de monomeri. Enzima nativă are 1,5 - 2 grupări sulfhidrilice/monomer iar enzima denaturată cu dodecilsulfat are opt grupe SH/monomer. Reactivitatea grupărilor SH libere nu se schimbă în prezenţa substratului acetil-CoA sau a inhibitorilor alosterici - α-cetoglutarat şi NADH.

Datele cu privire la legarea substratelor inhibitorilor sînt în general în conformitate cu comportarea modelelor alosterice,[(674,675)] care postulează interacţiuni cooperative datorită legării diferenţiate

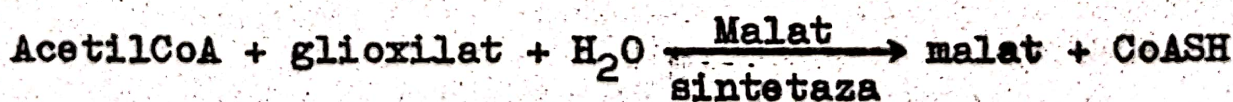
a liganzilor la două sau mai multe stări conformaţionale ale moleculei.

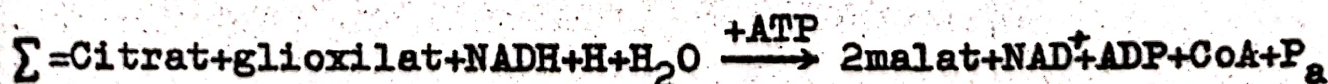
Mariyama[676] purificînd citrat sintetaza din inimă şi ficat de şobolan, găseşte unităţi identice cu greutate moleculară de $1x10^5$ compuse fiecare din cîte două subunităţi de asemeni identice. Proprietăţile cinetice sînt similare şi gradul de inhibiţie cu ATP este de asemeni similar. Turnoverul enzimei (capacitatea) este de $1,3x10^4$ moli substrat convertit/minut/moleculă de enzimă la 28°C. Enzima este mai concentrată în inimă decît în ficat raportată la greutatea organelor respective.

Lenz şi Buckel[622,623,624] arată că o ATP-citrat liază produce acetil CoA şi nu acetat din citrat. S-a obţinut malat din citrat după incubarea unei mixturi în care s-a combinat scindarea citratului cu NADH şi malat dehidrogenaza, ca şi cu glioxilat şi malat sintetază după ecuaţiile:


Citrat+ATP+CoASH ⟶ acetilCoA+oxalacetat+ADP+P

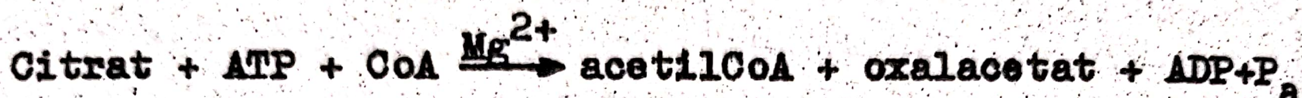

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + \text{H} \xrightarrow{\text{MDH}} \text{malat} + \text{NAD}^+$$


$$\text{AcetilCoA} + \text{glioxilat} + H_2O \xrightarrow[\text{sintetaza}]{\text{Malat}} \text{malat} + \text{CoASH}$$


$$\sum = \text{Citrat+glioxilat+NADH+H+}H_2O \xrightarrow{+ATP} \text{2malat+NAD}^+\text{+ADP+CoA+}P_a$$

O citrat liază sau cum se mai numeşte "enzimă de scindare a citratului" a fost obţinută şi purificată

din ficat de porc,[625] inimă de bovine,[626] inimă de porc,[627] din unele bacterii,[628] din ficat de găină,[629] şi din alte surse. Această enzimă catalizează reacţia :

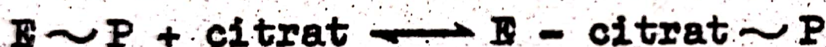


$$\text{Citrat} + \text{ATP} + \text{CoA} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{acetilCoA} + \text{oxalacetat} + \text{ADP} + P_a$$

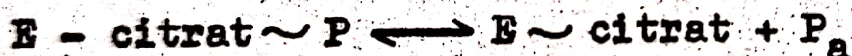
Studiindu-se reacţiile[671,672] parţiale ale enzimei, s-a ajuns la concluzia că scindarea citratului are loc după un mecanism ping-pong conţinînd următoarele etape:



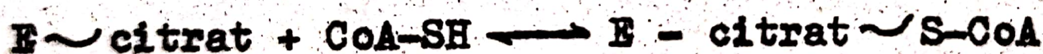
$$\text{ATP} + E \longleftrightarrow E \sim P + \text{ADP}$$



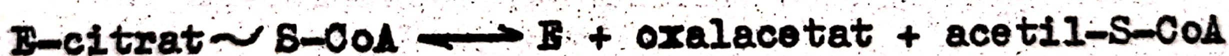
$$E \sim P + \text{citrat} \longleftrightarrow E - \text{citrat} \sim P$$



$$E - \text{citrat} \sim P \longleftrightarrow E \sim \text{citrat} + P_a$$



$$E \sim \text{citrat} + \text{CoA-SH} \longleftrightarrow E - \text{citrat} \sim \text{S-CoA}$$



$$E\text{-citrat} \sim \text{S-CoA} \longleftrightarrow E + \text{oxalacetat} + \text{acetil-S-CoA}$$

Este de reţinut şi faptul că în prima etapă intervin şi ionii de Mg^{2+}. Enzima poate fi purificată şi separată fără a fi contaminată cu enzima de condensare (sinteză) a citratului.

Citrat liaza participă în reglarea capacităţii de sinteză a acizilor graşi din ficat, dar nu cu rol principal.[630]

Srere[629] arată că citrat liaza este localizată în citoplasma celulară, acolo unde se sinteti-

zează cea mai mare parte a acizilor grași cu catenă carbonică lungă.

S-a demonstrat faptul că citratul este precursor în sinteza de acizi grași[631,632] și că în unele condiții, perturbările din sinteza acizilor grași sînt paralele cu perturbările din activitatea citrat liazei.

Se știe că citratul este un modulator negativ al fosfofructokinazei. Citratul produs în ciclul acizilor tricarboxilici în mitocondrii, poate părăsi mitocondria cu ajutorul unui sistem de transportor specifici pentru citrat, care se găsește în membrana mitocondrială și care reprezintă mobilul pentru transportul citratului în citoplasmă.

In condițiile de supraproducere de citrat, acesta acționează ca un inhibitor puternic pentru fosfofructokinază și deci pentru glicoliză, reducînd în acest mod și producerea de acetil CoA.

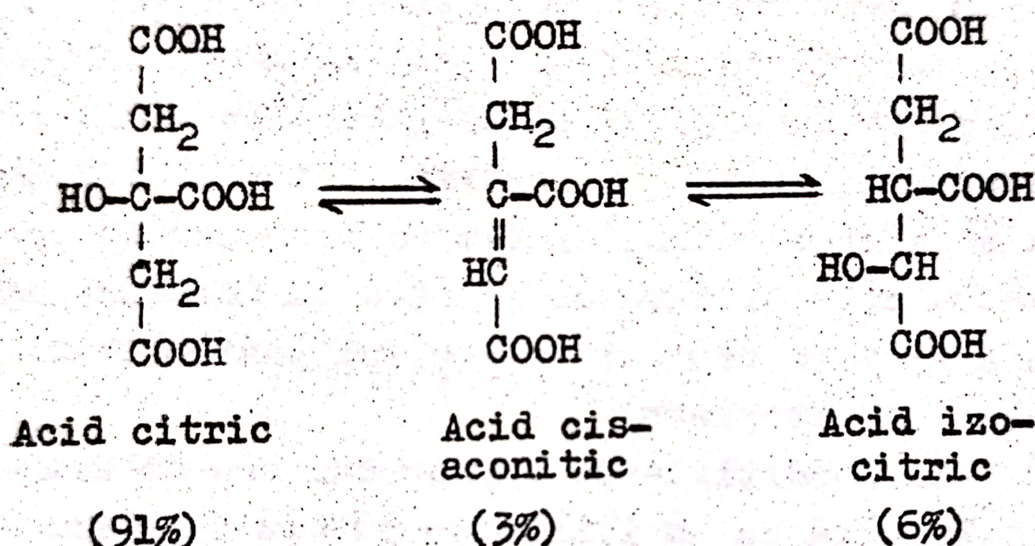
Așa cum am mai văzut, citratul în citoplasmă este supus și activității citrat liazei care-l scindează în prezența ATP și CoA în acetil CoA și oxalacetat, cu eliberare de ADP și P-anorganic.

Aconitaza(aconitat hidrataza sau citrat - izocitrat hidroliaza).

Aconitaza catalizează transformarea acidului citric în acid cis-aconitic, iar apoi acesta în acid izocitric. La pH 7,4 și la 25°C mixtura în echilibru conține circa 91 % citrat, 3 % cis-aconitat și 6 %

izocitrat. Reacţia implică adiţia reversibilă de apă la legătura dublă α, β a cis-aconitatului. Enzima este stabilizată şi activată de FeII şi cisteină.

Stereochimia şi mecanismul de acţiune a aconitazei a sevit ca obiect pentru multe studii. Reacţia aconitazei are loc după următoarea ecuaţie:



Aconitaza este o enzimă care a fost găsită atît în mitocondrii cît şi în citoplasma diferitelor ţesuturi de la diferite specii animale.[631,632,633,634]

In celulele ficatului de şobolan numai 22 % din totalul activităţii de aconitat hidratază este asociată cu mitocondria, în timp ce restul activităţii este găsită în citoplasmă.

Aconitat hidrataza din mitocondrii şi din citoplasmă au comportament diferit în timpul cromatografiei pe DEAE-celuloză, enzima mitocondrială fiind eluată mult mai rapid decît cea citoplasmatică. S-au cons-

tatat diferențe între enzima citoplasmatică și mitocondrială în ceea ce privește determinarea punctului izoelectric.[635] Pentru citrat și izocitrat K_m în producerea de izocitrat pare să fie asemănător pentru cele două forme ale enzimei. Activarea enzimei cu citrat și izocitrat pare să fie în aceleași limite pentru ambele forme.

Aceste date arată că enzima mitocondrială și citoplasmatică par să fie similare în comportamentul cinetic.

Aconitaza a fost găsită într-o serie de plante superioare. In timpul purificării se pierde activitatea enzimei care poate fi restaurată la adăugare de ioni feroși împreună cu cisteină, tioglicolat, ascorbat și glutation. Se pare că intracelular enzima este asociată cu un compus cu Fe care în procesul de purificare se separă și produce pierderea activității enzimei.[636]

Aconitaza, așa cum arată Villafranca[670] pe baza studiilor de rezonanță electronică paramagnetică de spin un atom Fe(III) care are un rol structural și necesită doi atomi Fe(II)/moleculă pentru activitatea catalitică. Fe(III) din enzima purificată nu este prezent în structura porfirinică și nici în structură asemănătoare cu cea a feredoxinei sau rubredoxinei, ci într-o structură asemănătoare cu cea a conalbuminei sau transferinei.

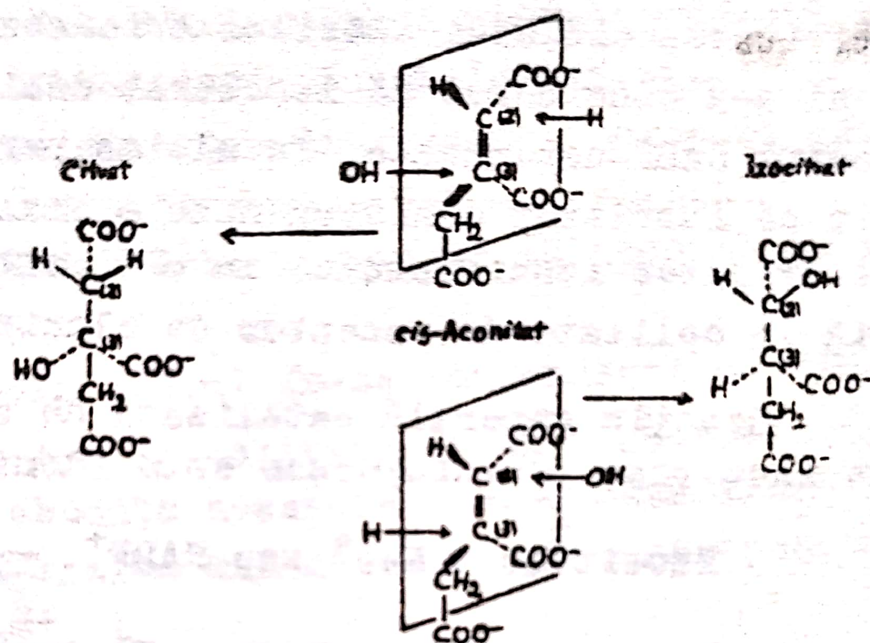
Activarea aconitazei cu Fe(II) și cisteină, arată prezența a două locuri de legătură cinetic bine distincte pentru 89.000 greutate moleculară.

Nu se ştie dacă aceste locuri sînt structural similare. Tot cu rezonanţă paramagnetică de spin s-au detectat două locuri de legătură pentru Mn^{2+} pe molecula de aconitază, care însă nu au importanţă pentru activitatea catalitică şi care nu sînt competitive cu Fe(II).

Aşa cum s-a arătat mai sus, fluorocitratul este un inhibitor **puternic** al aconitazei. De asemeni oxalmalonatul este un puternic inhibitor al aconitat hidratazei şi al izocitrat dehidrogenazei. Oxalmalonatul este cunoscut şi ca inhibitor al respiraţiei celulare.[637,638]

Intrucît atît oxalmalonatul cît şi hidroxicetoglutaratul (alt inhibitor al aconitazei) se formează în condiţii fiziologice de temperatură şi pH prin condensarea glioxilatului (CHO-COOH) fie cu oxalacetat fie cu piruvat, formarea acestor inhibitori joacă un rol probabil important în reglarea ciclului acizilor tricarboxilici.

Aconitat hidrataza este o enzimă care aşa cum am văzut poate cataliza în acelaş timp, adiţionarea de apă în două direcţii, una ducînd la formarea de acid citric, iar cealaltă la formarea de acid izocitric.
Din cauză că acidul izocitric are o conformaţie stereochimică specifică în jurul atomilor săi de carbon asimetrici, şi din cauză că acidul aconitic are o dublă legătură în cis, există restricţii sterice pe care elementele apei trebuie să le respecte atunci cînd se fixează la dubla legătură.
Lehninger[639] dă următoarea schemă de hidratare a cis-aconitatului în cele două direcţii :



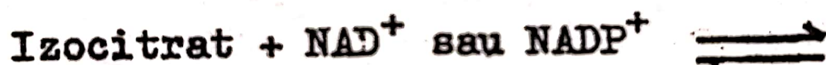
Din experienţe cu substrate marcate cu deuteriu, se poate deduce că H şi OH adiţionează la dubla legătură a cis-aconitatului, trans unul faţă de celălalt.

Activitatea aconitazei aşa cum s-a mai arătat este stabilizată de ionul de Fe, care în acelaş timp formează un chelat complex cu acidul citric.

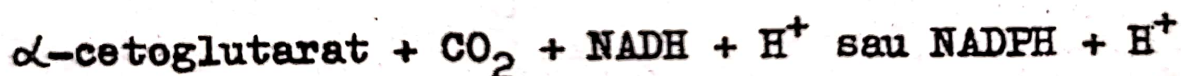
<u>Izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă.</u>

Izocitrat dehidrogenaza este o enzimă aloste-
ică care reprezintă un punct important de control pen-
ru activitatea ciclului acizilor tricarboxilici.
ulţi ani s-a considerat că izocitrat dehidrogenaza es-
e o enzimă NADP-dependentă. In ultima perioadă, s-a
tabilit că izocitrat dehidrogenaza - enzimă care cata-
izează oxidarea izocitratului în α- cetoglutarat -
ecesită în calitate de acceptor de electroni NAD sau
ADP.

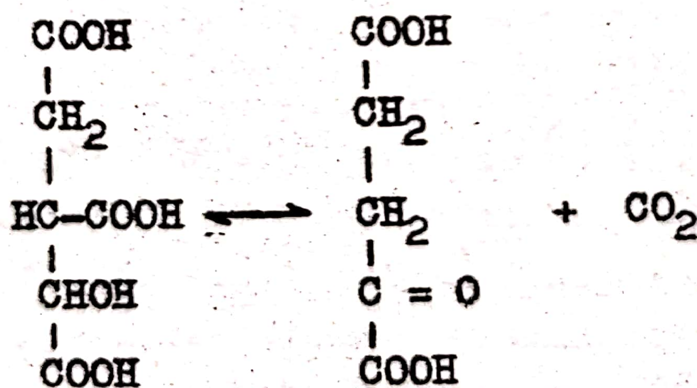
Reacţia generală catalizată de aceste două ti-
uri de izocitrat dehidrogenaze este identică :



Izocitrat + NAD^+ sau $NADP^+$ $\rightleftharpoons$



α-cetoglutarat + CO_2 + NADH + H^+ sau NADPH + H^+



Acid izocitric　　Acid α-ceto-glutaric

In mitocondrii pot fi găsite atît izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă cît şi izocitrat dehidrogenază NADP-dependentă.[646]

O izocitrat dehidrogenază NADP-dependentă a fost găsită şi în citoplasmă. In ciclul acizilor tricarboxilici aşa cum s-a stabilit recent, poate fi găsită numai izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă. Enzima NADP-dependentă este implicată în special în reacţiile biosintetice.

Enzima din ciclul Krebs (dependentă de NAD) necesită prezenţa ADP în calitate de activator alosteric specific. In absenţa acestuia enzima este inactivă. Pentru activitate,enzima mai necesită prezenţa ionilor de Mg^{2+} sau de Mn^{2+}.
Legarea ADP de locul alosteric are un efect stimulator maximal la concentraţii mici de izocitrat,fapt ce poate fi interpretat în sensul că ADP scade K_m a enzimei pentru izocitrat şi deci condiţionează creşterea afinităţii enzimei pentru substratul ei.

NADH inhibă puternic activitatea enzimei în competiţie cu NAD;un inhibitor puternic pentru activitatea enzimatică este şi ATP.

Rolul fiziologic al izocitrat dehidrogenazei NAD-dependente ca enzimă operativă în ciclul Krebs, a fost stabilit pe baza distribuţiei intracelulare a enzimei de către Goebell şi Klingenberg.[640,641] La aceleaşi concluzii ajunge şi Nicholls şi Garland[642].

Purificînd izocitrat dehidrogenaza din drojdie s-a observat că enzima este activată de către AMP care îi creşte afinitatea pentru NAD şi izocitrat.[643,644]

Studiind oxidarea piruvatului în mitocondriile muşchilor aripilor la insecte, Hansford[645] demonstrează că această oxidare este dependentă de ADP şi că enzima limitantă în această oxidare este izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă. Este posibil ca în oxidarea piruvatului, rol limitant să aibă şi etapa de oxidare a 2-oxoglutaratului, care de asemeni face să fie dependentă de concentraţii mari de ADP şi de P_a.

Izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă din inimă de bovine poate fi găsită într-o formă monomerică cu o greutate moleculară de 330.000 şi într-o formă dimerică. ADP pe lîngă efctul alosteric mai prezintă şi efectul de stimulator al dimerizării moleculei de izocitrat dehidrogenază .In această acţiune un efect contrar îl are NADH. Atît forma monomerică cît şi forma dimerică a enzimei sînt active. Forma dimeră pare mai activă însă, la concentraţii mici de ADP.

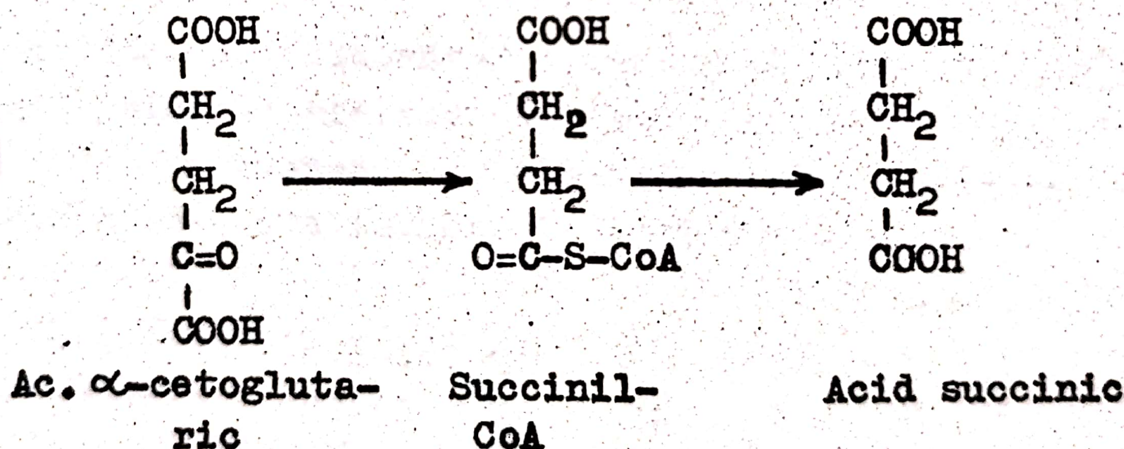
Dacă citrat sintetaza este primul punct de control al ciclului acizilor tricarboxilici, izocitrat dehidrogenaza reprezintă cel de al doilea punct de control al acestui ciclu.

In muşchii aripilor de la insecte izocitrat dehidrogenaza pare să fie factorul principal limitant al ciclului Krebs.

α-Cetoglutarat oxidaza

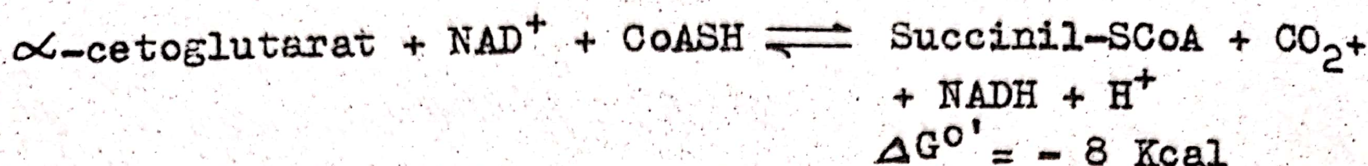
Oxidarea acidului α-cetoglutaric la succinat care la heterotrofe este ireversibilă, are loc în două etape. Intr-o primă etapă, α-cetoglutaratul este supus decarboxilării oxidative cu formare de succinil-S-CoA şi CO_2.

Intr-o a doua etapă, succinil-S-CoA care este un tioester macroergic al unei grupări carboxilice a acidului succinic, este scindată în acid succinic şi CoASH nu prin hidroliză simplă, ci printr-o reacţie care conservă energie cu guanozin difosfat şi Pa.



Ac. α-cetoglutaric — Succinil-CoA — Acid succinic

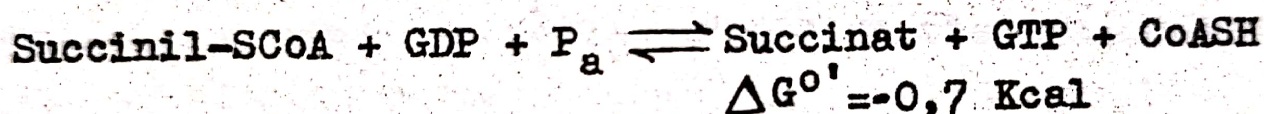
Formarea succinil-SCoA în prima etapă are loc în prezenţa unui complex multienzimatic α-cetoglutarat dehidrogenazic care este similar ca structură şi proprietăţi, complexului piruvat dehidrogenazic.[619,620] Reacţia catalizată de acest complex are loc după ecuaţia:



$$\alpha\text{-cetoglutarat} + NAD^+ + CoASH \rightleftharpoons \text{Succinil-SCoA} + CO_2 + NADH + H^+$$
$$\Delta G^{o'} = -\ 8\ Kcal$$

După cum se ştie, acest proces de decarboxilare oxidativă mai necesită participarea tiamin pirofosfatului (TPP) şi acidului lipoic.
Complexul α-cetoglutarat dehidrogenazic izolat din ţesuturi animale şi din E.coli, are o greutate moleculară de $2,1x10^6$.

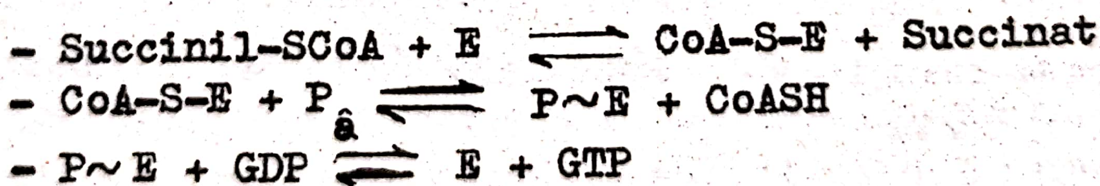
Etapa a doua este catalizată de succinil tiokinază sau succinil CoA sintetază:



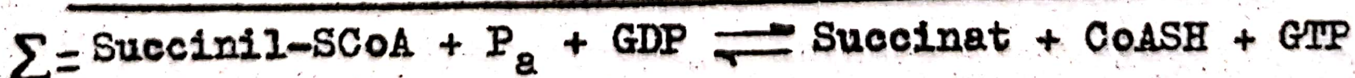
$$\text{Succinil-SCoA} + GDP + P_a \rightleftharpoons \text{Succinat} + GTP + CoASH$$
$$\Delta G^{o'} = -0,7\ Kcal$$

Formarea GTP se face pe seama legăturii tioesterice macroergice a succinil CoA. In celulele animale enzima este specifică pentru GDP şi P_a ca acceptor.

Reacţia succinil tiokinazei are loc în următoarele etape:



- $\text{Succinil-SCoA} + E \rightleftharpoons CoA\text{-}S\text{-}E + \text{Succinat}$
- $CoA\text{-}S\text{-}E + P_a \rightleftharpoons P{\sim}E + CoASH$
- $P{\sim}E + GDP \rightleftharpoons E + GTP$



$$\Sigma = \text{Succinil-SCoA} + P_a + GDP \rightleftharpoons \text{Succinat} + CoASH + GTP$$

S-a demonstrat experimental că în această secvenţă reacţională se formează un complex de enzimă fosforilată, la incubarea cu ^{32}P, succinil-SCoA şi Mg^{2+}, în absenţa GDP sau se formează un complex de enzimă

fosforilată la incubare cu GTP cu ^{32}P în prezența Mg^{2+} Restul 3-fosfohistidină este donatorul de fosfat în formarea GTP.

In reacția nucleozid difosfokinazei GTP format în această reacție donează gruparea fosfat terminală ADP -ului pentru a forma ATP după ecuația :

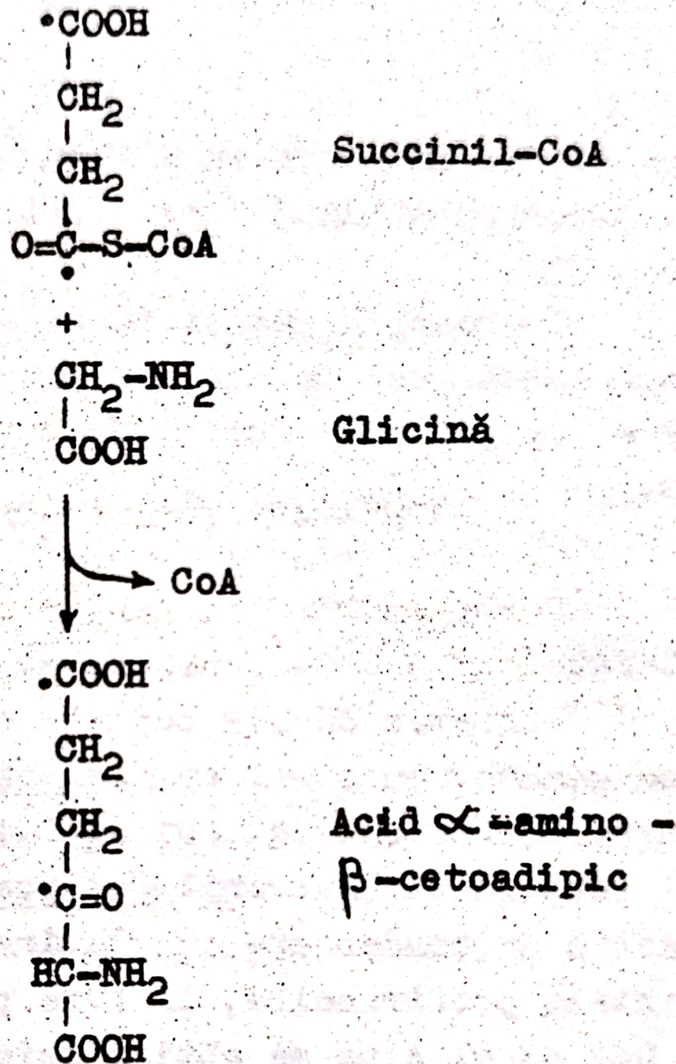


$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

Formarea GTP sau ATP în timpul oxidării α-cetoglutaratului nu este inhibată de 2,4 - dinitrofenol.

Formarea de ATP cuplată cu deacilarea succinil Coa poartă denumirea de <u>fosforilare la nivelul substratului</u>, pentru a o deosebi de fosforilarea cuplată cu lanțul respirator. Succinil CoA poate fi deacilată și în reacția de condensare cu glicina din ciclul Shemin din sinteza porfirinelor, în care prin condensarea succinil CoA cu glicina se obține acidul α-amino- β -cetoadipic.

Pe pagina următoare este redată schema biosintezei acestui acid;



Descriind mecanismul de oxidare a α- cetoglutaratului în E.coli, Hager și Kornberg(647) arată că acesta poate fi despărțit pentru prima etapă a acestei oxidări care se termină cu formarea de succinil - S-CoA în patru stadii :

1. α-Cetoglutarat + TPP $\rightleftharpoons$
[succinic semialdehidă] - TPP + CO_2

2. [Succinic semialdehida] - TPP + lip-S_{ox} $\rightleftharpoons$
succinil - S - lip. + TPP

3. Succinil-S-lip. + CoASH $\rightleftharpoons$
succinil - S CoA + lip - S_{red}

4. Lip - S_{red} + NAD^+ $\rightleftharpoons$ lip - S_{ox} + NADH + H^+

Suma: α - Cetoglutarat + NAD^+ + CoA-SH $\rightleftharpoons$
succinil - S - CoA + NADH + H^+ + CO_2

Massey(648,649) a stabilit că α- cetoglutarat dehidrogenaza conţine şi o componentă flavoproteinică cel puţin în ţesuturile animale.

Studiindu-se activitatea complexului α-ceto glutarat dehidrogenazei din Acinetobacter sp. s-a constatat că AMP şi ADP stimulează activitatea enzimei prin scăderea K_m pentru cetoglutarat. ATP şi NADH inhibă activitatea complexului.(650,651)

Studiul reglării cu adenilaţi ai complexului, arată că efectorii acţionează alosteric. Tratamentul cu uree 1 M desensibilizează complexul la AMP şi ADP fără

pierderea activității. Această desensibilizare, este însoțită de scăderea K_m pentru α-cetoglutarat. Efectele adenilaților și a NADH asupra complexului α-cetoglutarat dehidrogenazic este în concordanță cu un rol reglator în carbonul ciclului acizilor tricarboxilici. După cum se presupune, acest control operează la nivelul primei componente enzimatice și inhibiția cu NADH reprezintă un mecanism feedback în interiorul complexului propriu zis.

Membrana mitocondrială internă, conține un set de translocatori care catalizează reacțiile de schimb dintre anionii localizați în citoplasmă și cei localizați în spațiul matriceal al mitocondriei.

Reacții de schimb au fost demonstrate pentru adenin nucleotide și pentru marea majoritate a ciclului acizilor tricarboxilici.(652,653,654,655,656)
Translocarea are loc stoechiometric compus pentru compus. Mecanismul este însă necunoscut. Aceste translocări pot controla viteza secvențelor matabolice catalizate de enzime localizate în diferite compartimente celulare. Un translocator pentru α- oxoglutarat a fost pus în evidență în mitocondriile de ficat de șobolan și este de fapt un translocator pentru dicarboxilați care catalizează reacțiile de schimb dintre diferiți dicarboxilați ca, 2-oxoglutarat,malat,malonat și succinat. Acest translocator nu catalizează schimbul dintre acești anioni și ionii de fosfat.(656,657,658,660)

Afinitatea translocatorului pentru oxogluta-

rat este mai mare pentru substratele externe decît pentru substratele corespunzătoare interne. Constanta Michaelis creşte în următoarea ordine: oxoglutarat extern < malat extern < malonat extern < oxoglutarat intern < malat intern < malonat intern.

Afinitatea translocatorului pentru un substrat este independentă de natura ionului de schimb. Transportorul de oxoglutarat are o singură legătură pentru oxoglutarat şi pentru ceilalţi dicarboxilaţi. Tricarboxilaţii în concentraţii mari blochează transportorul, legîndu-se de locul de adiţie al substratului fără a fi transportaţi.(659) Se presupune că substratul se leagă prin grupările carboxilice de transportor prin intermediul unui ion metalic. Nu este însă exclusă şi formarea de punţi de hidrogen între substrat şi transportor.

Succinat dehidrogenaza.

Oxidarea acidului succinic în fumarat, se face cu ajutorul unei flavoproteine numită, succinat dehidrogenaza, care conţine flavin adenin dinucleotid legat covalent în calitate de acceptor de hidrogen.



$$\text{Succinat} + \text{E-FAD} \longleftrightarrow \text{fumarat} + \text{E-FADH}_2$$

Enzima redusă poate dona electroni la numeroşi acceptori de electroni artificiali, ca de ex. la coloranţi reducători; acceptorul normal de electron pentru succinat dehidrogenaza fiind încă insuficient cunoscut.

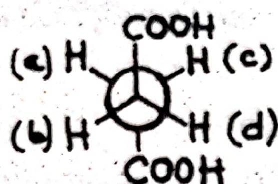
Succinat dehidrogenaza este puternic legată de membrana mitocondrială. Cu toate că a fost extrasă de pe membrană şi înalt purificată, este foarte probabil că are o organizare complexă a subunităţilor.

Enzima izolată din inimă de bovine, are o greutate moleculară de circa 175.000 şi conţine o moleculă de FAD legată covalent şi care poate fi eliberată prin digestia triptică a enzimei.

Enzima conţine de asemeni patru atomi de Fe, patru atomi de S într-o formă chimică necunoscută, şi care prin acidifiere duc la formarea de H_2S.

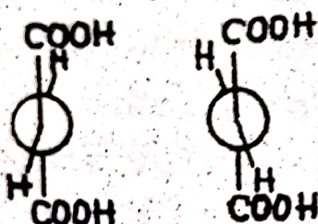
Este posibil ca în timpul activităţii succinat dehidrogenazei, atomii de Fe să sufere modificări de valenţă Fe(II) - Fe(III). Fierul din succinat dehidrogenază este Fe neheminic. Fierul neheminic şi atomii de sulf labili, sînt prezenţi în subunităţi distincte de succinat dehidrogenază, denumite proteine cu fier neheminic.

Stereochimia eliberării ionilor de hidrogen de pe succinat cu ajutorul succinat dehidrogenazei, a fost studiată şi cu ajutorul deuteriului (^2_1H) ca atom marcat, s-a putut stabili că dehidrogenaza rupe de pe succinat atomii de hidrogen din poziţia trans a carbonului metilenic a succinatului, după reacţia redată pe pagina următoare :

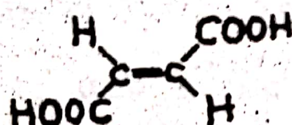


Acidul succinic

Trans-dehidrogenaza



Acidul fumaric



Succinat dehidrogenaza îndepărtează perechea trans a atomilor de H, a + d şi b + c pentru a forma acidul fumaric un compus trans. Enzima nu îndepărtează perechea cis a + b sau c + d. In acidul fumaric grupele carboxil şi atomii de H care rămîn sînt în plan perpendicular pe pagină.

Pe baza unei colaborări iniţiate între laboratoarele din Konstanţa, San Francisco, şi Stockolm în 1965, se încep studii de stabilirea structurii succinat dehidrogenazei. Astfel s-a stabilit că lanţul peptidic este legat la ciclul benzenic al riboflavinei în poziţia 8-α-metilenică.(662,663)

S-a mai demonstrat că structura polipeptidică se leagă de structura flavinică printr-un rest de histidină şi anume, cu un azot din ciclul imidazolic.(664)

Ulterior s-a sintetizat histidil-8-α-riboflavina[665] şi s-a elucidat structura secvenţională la nivelul centrului activ.[666,667]

S-a izolat un flavinpentapeptid de pe membrana internă mitocondrială de inimă, şi din succinat dehidroganaza purificată şi solubilă.[668] Studiind aceste structuri, s-a ajuns la concluzia că gruparea prostetică FAD a succinat dehidrogenazei mitocondriale, este legată covalent prin poziţia 8-α de proteină.

Prin hidroliză acidă[669] s-a putut stabili că există în succinat dehidrogenază un raport histidină/FAD egal cu 1/1.

Succinat dehidrogenaza are unele din proprietăţile unei enzime alosterice şi anume, este activată de fosfat, succinat, şi fumarat, şi este complet inhibată de concentraţii extrem de mici de oxalacetat. Deci, acumularea de oxalacetat, ultimul acid dicarboxilic din ciclul Krebs, poate să inhibe propria-i formare din succinat. Oxalacetatul este un inhibitor mai puternic al succinat dehidrogenazei decît malonatul.

Urmărind activitatea succinat dehidrogenazei în procesul de evoluţie, s-a observat că în trecerea de la anaerobioză la anaerobioza facultativă, se dezvoltă tendinţa enzimei de a cataliza reducerea fumaratului mai rapid decît oxidarea acestuia.[677,678]
Organismele anaerobe facultative conţin o singură succinat dehidrogenază, proprietăţile căruia sînt adaptate egal la metabolismul aerob şi la cel anaerob, sau conţin

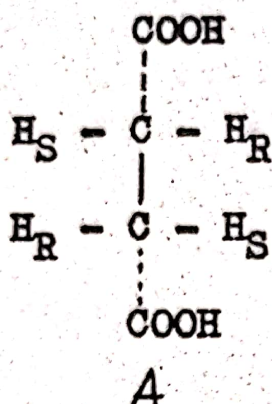
două enzime ca în E.coli în care o enzimă predomină în creşterea aerobă a celulei, asemănătoare cu enzima mamiferelor, iar cealaltă predomină în creşterea anaerobă a celulelor şi este adaptată la funcţia reductivă.(679)
S-a văzut deci, că la aceste microorganisme cu viaţă anaerobă facultativă, există două enzime care catalizează fie oxidarea succinatului, fie reducerea fumaratului. Ambele enzime sînt particulate - legate de structură- iar separarea lor s-a obţinut prin obţinerea unei mutante (S^-) care pierde o enzimă şi menţine capacitatea de sinteză pentru cea de a doua.

In succinat dehidrogenaza, FAD este legat covalent iar gruparea prostetică constituie un bloc constitutiv al enzimei; în schimb în fumarat reductază flavina nu este legată covalent.

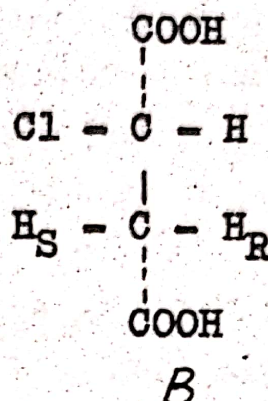
Recent(680) studiindu-se schimbul de hidrogen între (S)-clorosuccinat şi apă în prezenţa succinat dehidrogenazei cu ajutorul spectrometriei de masă, rezonanţei magnetice nucleare şi a dispersiei optice rotatorii, s-a ajuns la concluzia că succinat dehidrogenaza, catalizează un schimb de doi atomi de hidrogen şi anume: H metinic şi H_R al grupării metilenice. Procesul de schimb a celor doi atomi de hidrogen are loc simultan.

Incubînd succinat nemarcat în ^2H_2O s-a observat că H_R - atomii sînt schimbaţi de trei ori mai rapid decît H_S-contrapartenerii.

Dăm mai jos formulele structurale ale acidului succinic (A) şi a acidului (S)-clorosuccinic (B).



A



B

După această incubare s-a observat că se acumulează acidL-succinic(S)-clorosuccinatul reprezintă un substrat pentru succinat dehidrogenaza atît în procesul de oxidare cît şi în reacţia de schimb anaerob. Incubînd acest **compus** cu succinat dehidrogenază s-a observat că schimbul afectează în special atomi H_R ai grupării metilenice.

Studiindu-se transportul succinatului în veziculele membranare de la E.coli, Bacillus subtilis, şi Pseudomonas, s-a observat că acesta are loc printr-un sistem de transport activ legat de lanţul transportor de electroni.

Inhibitorii lanţului respirator inhibă şi transportul succinatului. Activitatea succinat dehidrogenazei legată de membrana bacteriană nu este legată şi de transportul succinatului. Transportul succinatului este puternic inhibat de către alţi acizi tricarboxilici din aceste trei microorganisme, sugerînd faptul că aceştia folosesc acelaş transportor. Transportul de succinat este represat de glucoză.

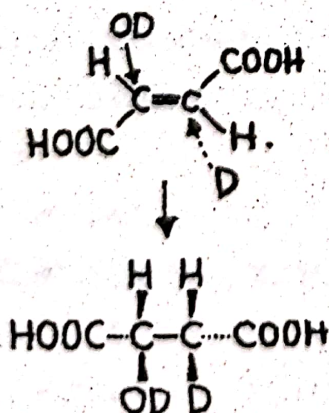
Fumaraza.

Hidratarea reversibilă a fumaratului la L-malat este catalizată de fumarază,o enzimă obținută în stare cristalină din inimă de porc.Reacția are loc după următoarea ecuație:



$$\text{Fumarat} + H_2O \rightleftharpoons \text{L-malat}$$

Fumaraza activează stereospecific întrucît ea formează numai stereoizomerul L-malat.Studiile stereochimice ale mecanismului enzimei folosind apă marcată cu deuterium au arătat că fumaraza catalizează trans-adiția de H și OH la dubla legătură a fumaratului.Deși fumaratul este o moleculă simetrică,gruparea OH poate fi adiționată numai de o singură parte a dublei legături formînd stereoizomerul L-malat.



eritro-3 monodeutero-L acid malic

Greutatea moleculară a enzimei este în jur de 200000;este un tetramer care la desfacere în forme monomere devine inactiv.ATP scade afinitatea fumarazei pentru fumarat.

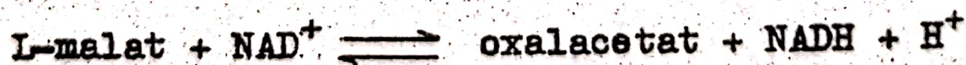
Studiind activitatea fumarazei din muşchiul de inimă de porc,Albright[681] observă că enzima catalizează şi hidratarea L-izomerului de trans 2,3-eposuccinat pentru a forma mezotartrat.Si această reacţie este stereospecifică.

Fumaratul acţionează ca inhibitor al reacţiei de hidratare a L-trans-2,3-eposuccinatului de către fumarază şi invers L-trans-2,3-eposuccinatul inhibă activitatea fumarazei de transformare a fumaratului în malat.

Mezotartratul este un inhibitor puternic a transformării fumaratului în malat.[682]

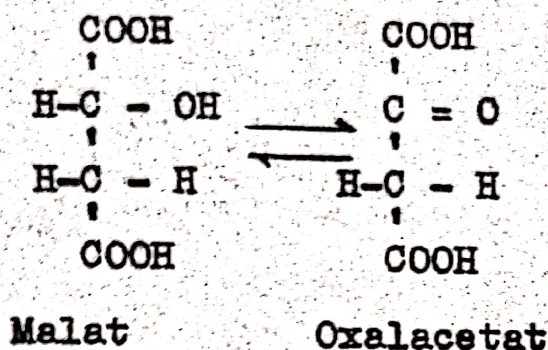
Malat dehidrogenaza.

Ultima reacţie în ciclul Krebs este malat dehidrogenaza care catalizează oxidarea malatului în oxalacetat după ecuaţia:



$$\text{L-malat} + NAD^{+} \rightleftharpoons \text{oxalacetat} + NADH + H^{+}$$

$$\Delta G^{o\prime} = -7,1 \text{ Kcal.}$$



Malat Oxalacetat

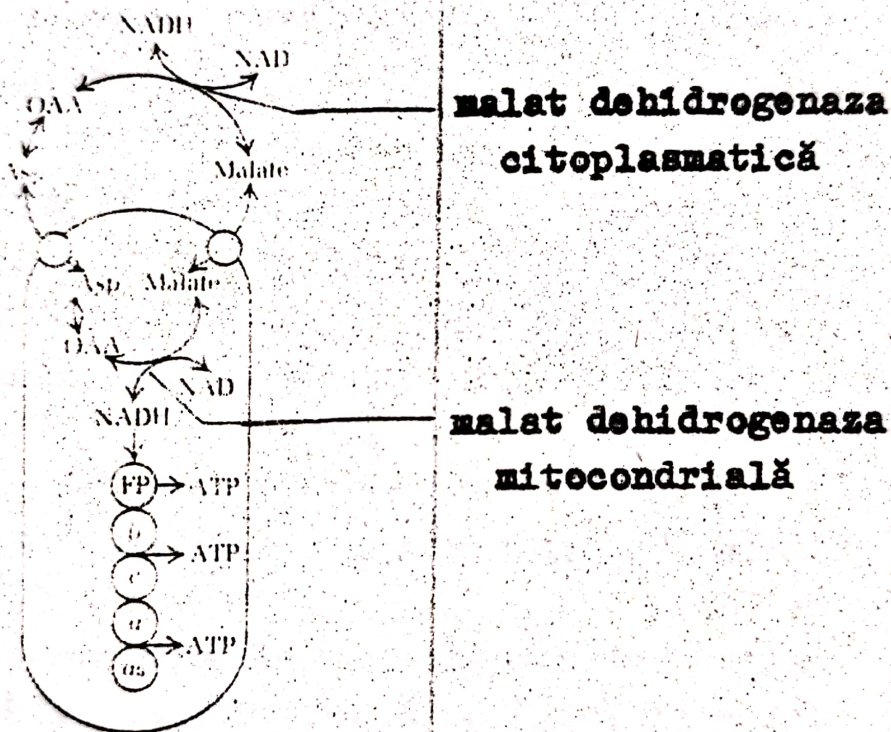
NADP participă numai într-o mică măsură ca acceptor de hidrogen în reacţie.

Există două tipuri de malat dehidrogenaze, o malat dehidrogenază mitocondrială şi una citoplasmatică. Studiind comparativ cele două malat dehidrogenaze, Holbrook(683) arată că ambele enzime leagă o moleculă de NADH pentru fiecare subunitate. Cu creşterea pH-ului, legarea NADH de enzimă se face mai greu. In funcţie de pH există diferenţe în constanta de disociere a NADH şi hidroximalonatului.

Malat dehidrogenaza din citoplasmă este o enzimă alosterică şi leagă două molecule de NADH per $8x10^4$ g enzimă (greutatea moleculară a formei dimer a enzimei).(684, 685)

Lehninger descrie un aşa numit ciclu al malatului în ficat în care NADH extramitocondrial este oxidat de către oxalacetat sub acţiunea malat dehidrogenazei citoplasmatice pentru a forma malat care intră în mitocondrie mobilizat de un sistem de transportori specifici pentru malat-succinat. Malatul este apoi oxidat la oxalacetat sub acţiunea unei malat dehidrogenaze intramitocondriale.

După cum se vede în figura de mai jos,[686] ciclul malatului este reversibil și funcționează în ambele direcții:



Ferguson[687] descrie o inactivare a malat dehidrogenazei din celulele de drojdie cu ajutorul glucozei. Inhibiția cu glucoză a activității malat dehidrogenazei este pusă pe seama unui efect de "inactivare-represie" care descrie un tip de represie catabolică în care activitatea enzimatică scade după adăuga-

rea represorului.

Malat dehidrogenaza localizată în mitocondria de inimă reprezintă o proteină omogenă la analiza ultracentrifugală şi imunochimică.[688] Cu toată omogenitatea au fost descrise cîteva forme enzimatic active ale enzimei mitocondriale.[689][690,691,692,693]
In forma nativă aceste forme de malat dehidrogenază arată mobilitate electroforetică deosebită, în schimb proprietăţi cinetice şi stabilitate termică identică.

Malat dehidrogenaza din mitocondriile şi citoplasma de ficat de şobolan se deosebesc după viteza de reacţie în dependenţă de concentraţia oxalacetatului.

In foame activitatea malat dehidrogenazei din citoplasmă scade, în timp ce activitatea enzimei din mitocondrii creşte. Această crestere este oprită de actinomicynă.

Se consideră că reglarea malat dehidrogenazei din mitocondrii este efectuată în sensul unei represii cu hidraţi de carbon sau cu metaboliţi proveniţi din metabolismul hidraţilor de carbon.[694,695,696,697]

O serie de lucrări arată că malat dehidrogenaza mitocondrială participă în gluconeogeneza hepatică.

Este posibil ca numai o fracţiune a activităţii malat dehidrogenazei crescută în foame, să fie necesară pentru glucomeogeneză, în timp ce malat dehidrogenaza mitocondrială prezentă în stare normală de nutriţie să funcţioneze în catabolismul hidraţilor de carbon în ciclul acizilor tricarboxilici.[694]

Malat dehidrogenaza conţine în structura sa 14 pînă la 16 resturi de cisteină mascate şi care nu reacţionează cu para-cloromercuribenzoatul (PCMB) sau alte săruri de mercur.[698,699]

In structura malat dehidrogenazei din inimă de porc s-a demonstrat prezenţa unui rest de histidină,esenţial pentru activitatea enzimatică.[699,700] Iod acetamidą inhibă enzima iar NADH protejează activitatea enzimei.Efect protector asupra activităţii enzimei o are şi o mixtură de oxalacetaţ şi NAD sau ADP-riboză dar nu oxalacetatul şi malatul. Această demonstrează formarea unui complex ternar activ.

Pentru transportul malatului prin membrana mitocondrială în activitatea ciclului malatului descris de Lehninger,au fost identificaţi în aceste membrane transportori specifici pentru malat.[653]

Procesul de fosforilare oxidativă nuclear.

Konings[701] arată că dacă procesul de fosforilare oxidativă din nucleii celulelor hepatice este controversat, în nucleii izolaţi din timus acesta este o realitate.

Faptul că respiraţia acestor nuclei şi sinteza de ATP nu este afectată de iodacetat (5×10^{-2}M) arată că hidraţii de carbon nu reprezintă substrate pentru respiraţia nucleară.[702]

Se ştie că iodacetatul este inhibitor specific

al glicerin 3-fosfat dehidrogenaza.

Pentru respirația nucleară, principala sursă de respirație o reprezintă acizii grași endogeni. Oxidarea nucleară a lipidelor este afectată de oligomicynă, 2,4-dinitrofenol (DNP) și antimicyna A în aceeași măsură în care se inhibă și respirația nucleară.[701,703]

S-a arătat că fosforilarea oxidativă nucleară <u>in vitro</u> nu poate fi stimulată de substrate adăugate exogen, și că este total dependentă de surse endogene.[701, 704,705,706] Nucleii de timus conțin toți citocromii implicați în lanțul respirator și anume citocromul a, a_3, b, c, și c_1.

Berezney[707] arată că în nucleii celulelor animale sînt prezente toate enzimele oxidative și propune schema unui sistem de transport de electroni pentru nucleii celulari.

Enzime oxidative au fost izolate din nucleii de ficat de șobolan,[708] de șoarece,[709] de bovine.[710,711]

Enzimele respiratorii sînt puternic concentrate în fracțiunile de membrană nucleară.[712]

Consumul de O_2 nuclear diferă de cel mitocondrial printr-o rezistență mare la inhibiția cu histone și o rezistență față de inhibiția cu ADN-ază. Preparatele nucleare sînt lipsite de coenzima Q.
Raportul NADH/citocrom c oxidaza este 1,3 în nucleu și o,5 în mitocondrii.

Rolul fiziologic al respirației nucleare pentru activitatea celulară rămîne încă neclar.

Bibliografie

1. LEHNINGER A.L. - Biochemistry,Worth Publishers Inc. 1972 N.Y. p.3
2. BÜCHER TH.,KLINGENBERG M. - Angew.Chem. 70,552,(1958
3. PALADE G. - J.Cell.Biol. 1,188,(1953)
4. WHITTAKER V.P. in "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria" (J.M.Tager,S.Popa E.Quagliariello,E.C.Slater,eds.) Vol.7 Elsevier (B.B.A.Library, Amsterdam p,1 1966)
5. ANDREJ - J.Ultrastruct.Res.Suppl. 3 (1962).
6. BROSEMER R.W.,VOGELL W.,BÜCHER TH. - Biochem.Z. 338, 854,(1963)
7. NASS M.M.K. - Science 165,26,(1969).
8. KROON A.M. - Handbook of Molecular Cytology (Ed.A Lima-De-Faria North Holland,Amsterdam,London p.875,1969).
9. SWIFT H.,WOSTENHOLME D.R. - Handbook of Molecular Cytology(Ed.A.Lima De-Faria North Holland,Amsterdam,London.p.972,1969
10. LUCK D.J.L.,REICH E. - Proc,Natl.Acad.Sci.U.S. 52, 931,(1964).
11. RABINOWITZ M.,SWIFT H. - Physiol.Rev. 50,376,(1970)
12. KROON A.M.,SACCONE C.,BOTTMAN M.J. - Biochim.Biophys Acta 142,552,(1967).

13. WINTERSBERGER E. - Z.Physiol.Chem. 336,285,(1964)
14. KALF G.F. - Biochemistry 3,1702 (1964)
15. KUROIWA P. - Exp.Cell.Res. 78,351,(1973).
16. OJALA D.,ATTARDI G. - J.Mol.Biol. 65,273,(1972).
17. O'BRIEN T.W.,KALF G.F. - J.Biol.Chem. 242,2172, (1967).
18. O'BRIEN T.W.,KALF G.F. - J.Biol.Chem. 242,2180,((1967).
19. RANK G.H. - Canad,J.Genet.Cytol. 12,129,(1970).
20. PARSONS J.A. - J.Cell,Biol, 25,641,(1965).
21. STONE G.E.,MILLER O.L. - J.Expt.Zool. 159,33,(1965)
22. GUTTES E.W.,HANAWALT P.C.,GUTTES S. - Biochim.BIo-phys.Acta 142,181,(1967).
23. PARSONS J.A.,RUSTAD R.C. - J.Cell.Biol. 37,683, (1968).
24. REICH E.,LUCK D.J.L. - Proc,Nat.Acad.Sci.Wash. 55, 1600,(1966).
25. WINTERSBERGER E. - Biochem.Biophys.Res.Comm. 25,1, (1966).
26. PARSONS P.,SIMPSON M.V. - Science 155,91,(1967).
27. MATTOCCIA-PICA L.,ATTARDI G. - J.Mol.Biol. 64,465, (1972).
28. LINNANE A.W., in "Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria" ed.by Slater E.C.,Tager J.M.,Papa S.,Quagliariello E.,Bari-Adriatica Editrice p.333 (1968).

29. LINNANE A.W.,HASLAM J.M. in "Current Topics in Cellular Regulation ed.by Horecker B.L.,Stadtman E.R. Vol.II p.101, Acad.Press. N.Y. 1970.
30. THOMAS D.Y.,WILKIE D. - Genet.Res.Camb. 11,33,(1968
31. COEN D.,DEUTSCH J.,NETTER P.,SLONIMSKI P.P. in in "Control of Organelle Development Ed. by Miller P.L. Cambrige Univ.Press. p.449 (1970).
32. GINGOLD E.B.,SAUNDERS G.W.,LUKINS H.B.,LINNANE A.W. - Genetics 62,735,(1969).
33. SAUNDERS G.W.,GINGOLD E.B. in "Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplast"Ed. by Boardman M,K.,Linnane A.W.,North Holland Publ.Com. p.185 (1971).
34. RANK G.H. - Canad.J,Genet.Cytol. 12,129,(1970).
35. ANTILIO L.A.,APPEL S.H.,PETTIS P.,GAMBETTI P.L. - Biochemistry 7,2615,(1968).
36. MORGAN I.G.,AUSTIN L. - J.Neurochem. 15,41,(1968).
37. HERNANDEZ A.,BURDETT I.,WORK T.S. - Biochem.J. 124, 327,(1961).
38. GORDON M.W.,DEANIN G.G. - J.Biol.Chem. 243,4222, (1968).
39. CUNINGHAM R.D.,BRIDGERS W.F. - Biochem.Biophys.Res. Commun. 38,99,(1970).
40. GRAY E.G.,GUILLERY R.W. - Int.Rev.Cytol. 18,111, (1966).

41. WHITTAKER V.B. - Progr.Biophys.Molec.Biol. 15,39, (1965).
42. BLOND D.M.,WHITTAM R. - Biochem.J. 92,158,(1964).
43. MORGAN I.G. - FEBS Lett, 10,273,(1970).
44. GAMBETTI P.,GONATAS N.K. - J.Cell.Biol. 174,68 a, (1970).
45. O'BRIEN T.W.,KALF G.F. - J.Biol.Chem. 242,2172, (1967).
46. O'BRIEN T.W.,KALF G.F. - J.Biol.Chem. 242,2180, (1967).
47. WATSON M.L.,ALDRIDGE W.G. - J.Histochem.Cytochem. 12,96,(1964).
48. KISLEV N.,SWIFT H.,BOGORAD L. - J.Cell.Biol. 25, 327,(1965).
49. MUNRO H.N.,FLECK A. - Analyst. 91,78,(1966).
50. LOWRY O.H.,ROSENBROUGH M.J.,FARR A.L.,RANDALL R.J. - J.Biol.Chem. 193,265,(1951).
51. LOEWY A.G.,SIEKEVITZ P. in "Cell Structure and Function" 2-nd.Edition,Holt Rinehart and Winston London N.Y. Sydney,Toronto, p.33,(1972).
52. PALADE G.E. - J.Histochem.Cytochem. p.188,(1953).
53. GRANIK S. - in "The Çell" J.Braçhed,Kirky A.E. Ed. Açad.Press. N.Y. p.242,(1961).
54. Granik S.,GIBOR A. - Science 145,820,(1964).
55. NOVIKOFF A.B. in "The Çell" Vol.2,p.299,Acad.Press. (1961).
56. FRY M.,WEISSBACH A. - Biochemistry 12,3602,(1973).

57. NASS M.W.K. - Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 56,1215,(1966)
58. CORNEO G.,ZARDI L.,POLLI E. - J.Mol.Biol. 36,719, (1968).
59. CLAYTON D.A.,VINOGRAD J. - Nature 216,652,(1967).
60. CLAYTON D.A.,VINOGRAD J. - Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 62,1077,(1969).
61. NASS S. - Biochim.Biophys.Acta. 145,60,(1967).
62. PARSONS J.A.,ARISTAD R. - J.Cell.Biol. 37,683,(1968)
63. GROSS N.J.,RABINOWITZ M. - J.Biol.Chem. 244,1863, (1969).
64. PARSONS P.,SIMPSON M.V. - Science 155,91,(1967).
65. BREWER E.N.,DEVRIES A.,RUSCH H.P. - Biochim.Biophys.Acta 145,686,(1967).
66. KAROL M.H.,SIMPSON M.V. - Science 162,770,(1968).
67. KALF G.F.,CHIH J.J. - J.Biol.Chem. 273,7907,(1968).
68. MEYER R.R.,SIMPSON M.V. - Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 61,130,(1968).
69. MEYER R.R.,SIMPSON M.V. - J.Biol.Chem. 245,3426, (1970).
70. WU G.J.,DAWID I.B. - Biochemistry 11,3589,(1972).
71. REID B.D.,PARSONS P. - Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 68, 2830,(1971).
72. MADRAIAH V.T.,SHARMA R.K.,BALACHANDAR V.,REZVANI I., COLLIP P.J.,CHEN S.Y. - J.Biol.Chem. 248,4263,(1973).
73. CARDELL R.R. - Biochim.Biophys.Acta 148,539,(1967).
74. MELHNISH A.H.,GREENBAUM A.L. - Biochem.J. 78,392, (1961).

75. NISHIMURA S.,NOVELLI G.D. - Biochim.Biophys.Acta 80,574,(1964).
76. MAHLER H.R.,PERLMAN P.S. - Biochemistry 10,2979, (1971).
77. ASHWELL M.,WORK T.S. - Annu.Rev.Biochem. 39,251, (1970).
78. SCHATZ G. - Biochim.Biophys.Acta 96,342,(1965).
79. CRIDDLE R.S.,SCHATZ G. - BIOCHEMISTRY 8,322,(1969).
80. PALTAUF F.,SCHATZ G. - Biochemistry 8,335,(1969).
81. PLATTNER H.,SCATZ G. - Biochemistry 8,339,(1969).
82. PLATTNER H.,SALPETER M.M.,SALTZGABER J.,SCATZ G. - Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 66,1252,(1 (1970).
83. GROOT G.S.P.,ROUSLIN W.,SCHATZ G. - J.Biol.Chem. 247,1735,(1972).
84. FUKUHARA H.,KUJAWA C. - Biochem.Biophys.Res.Commun 41,1002,(1970).
85. SCHATZ G. in "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts" edit.by Racker E.,Vol. 165,p.251,American Chemical Society Monographs,Van Nostrand Reinhold, N.Y.(1970).
86. RUBIN M.S.,TZAGOLOFF A. - J.Biol.Chem. 248,4275, (1973).
87. RUBIN M.S.,TZAGOLOFF A. - J.Biol.Chem. 248,4269, (1973).

88. SEBALD W.,WEISS H.,JACKL G. - Eur.J.Biochem. 30, 413,(1972).
89. WEISS H.,SEBALTL W.,BÜCHER T. - Eur.J.Biochem. 22,19, (1971).
90. ANDERSON B.N.,CIOTTI C.J.,KAPLAN N.O. - J.Biol.Chem. 234,1219,(1959).
91. SAKURAI T.,HOSOYA H. - Biochim.Biophys.Acta 112,459 (1966).
92. LORING H.S.,FAIRLEY J.L.,BORTNER H.W.,SEAGRAN H.L.- J.Biol.Chem. 197,809 (1952).
93. ACKERMANN W.W..POTTER V.R. - Proc.Soc.Exptl.Biol. Med. - 72,1 (1949).
94. TZAGALOFF A.,MEAGHER P. - J.Biol.Chem.247,594 (1972)
95. MASON Z, POYTON R.O. - Fed.Proc. 31,1401 (1972)
96. KRAML J.,MAHLER H.R. - Immunochemistry 4,213 (1967).
97. LOEWY A.G.,SIEKEVITZ P. in "Cell Structure and Function" Holt Reinehart and Winston, London,N.Y,Sydney,Toronto,p.314(1972).
98. PALADE G.E. - Anat.Rec. 114,427 (1952).
99. SJOSTRAND F.S. - Nature,171,30,(1953).
100. PALADE G.E. - J.Histochem.Cytochem. 1,188 (1953).
102. FERNANDEZ-MORAN H. - Circulation 26,1039 (1962).
103. RACKER E.,TYLER D.D.,ESTABROOK R.W.,CONOVER T.E., PARSONS D.F.,CHANCE B in "Oxodases and Related Redox Systems" (T.S. King ,H.S.Mason,Morrison,edt) Vol.2 p.1077 Wiley,N.Y.(1965).

104. RACKER E, CHANCE B, PARSONS D.F. - Federation Proc. 23,431 (1964).
105. PENEVSKY H.S., WARNER R.C. - J.Biol.Chem.240,4694, (1965).
106. PARSONS D.F. - Int.Rev.Exptl.Pathol. 4,1 (1965).
107. PARSONS D.F., WILLIAMS G.R. - Methods Enzymol. 10, 443 (1967).
108. HACKENBROOK C.R. - J.Cell.Biol. 30,269 (1966).
109. HACKENBROOK C.R. - J.Cell.Biol. 37,345 (1968).
110. HACKENBROOK C. R - Proc.Nat. Acad.Sci.U.S.61,598, (1968).
111. DEAMER D.W, UTSUMI K, RACKER L - Arch.Biochem. Biophys. 121,641 (1967).
112. PACKER L, WRIGGLESWORTH J.M, FORTES P.A.G, PRESSMAN B.C. - J.Cell.Biol. 39,382(1968).
113. HACKENBROOK C.R, KAPLAN A.I. - J.Cell.Biol.42,221, (1969).
114. GREEN D.E, ASAI J, HARRIS R.A, PENNISTON J.T - Arch. Biochem.Biophys. 125,648 (1968).
115. WEINBACH E.C, GARBUS J, SHEFFIELD H.G - Exp.Cell.Res. 46,129 (1967).
116. STONER C.D, SIRAK H.G - Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem.349,1017 (1968).
117. PFAFF E, KLINGENBERG M, RITT E, VOGELL W. - Eur.J. Biochem. 5,222 (1968).
118. WEBER N.E, BLAIR P.V. - Biochem.Biophys.Res.Commun 36,987 (1969).
119. WRIGGLESWORTH J.M, PACKER L. - Arch.Biochem.Bio-

120. phys.133,194 (1969).
120. MITTCHELL P . - Biol.Rev.Cambridge Phil.Soc. 41,445, (1966).
121. PACKER L.,UTSUMI K. - Arch.Biochem.Biophys. 131,386 (1969).
122. LEHNINGER A.L. - Physiol.Rev. 42,467,(1962).
123. SOTTACASA G.L.,KUYLENSTIERNA B.,ERNSTER L.,BERGSTRAND - J.Cell.Biol. 32,415,(1967).
124. PARSONS D.F.,WILLIAMS G.R.,CHANCE B. - Ann.N.Y.Acad. Sci. 137,643,(1966).
125. CHAPPELL J.B. - Brit,Med,Bull. 24,150,(1968).
126. RAW I. - J.Amer.Chem.Soc. 77,503,(1955).
127. COOPER C.,LEHNINGER A.L. - J.Biol.Chem. 219,489, (1956).
128. LÖW H.,VALLIN I. - Biochim.Biophys.Acta 69,361,(1963)
129. LEE C.,ERNSTER L. in "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria" edited. Tager J.M.,Papa S.,Quagliariello, Slater E.C. - Biochim.Biophys. Acta Library 7,218,(1966),Elsevier Amsterdam.
130. Racker E. in "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts"(Racker E. ed.p.127,Van Nostrand-Reinhold N.Y.(1970).
131. Bachmann E. - Arch.Biochem.Biophys. 121,73,(1967).
132. FESSENDEN-RADEN J.M.,RACKER E. in "Structure and Function of Biological Membranes " edited by Rothfield L.I.,Acad. Press.N.Y.,London p.401,(1971).

Acad.Press London p.119 (1970).
655. VAN DAM K, MEYER A.J. - Ann.Rev. Biochem. 40, 115 (1971)
656. SLUSE F.E, RANSON M, LIEBECQ C. - Eur.J.Biochem. 25 207 (1972).
657. DE HAAN E.J, TAGER J.M, - Biochim.Biophys.Acta 153 98 (1968)
658. ROBINSON B.H, WILLIAMS G.R, HALPERIN M.L, LEZNOFF C.C. - Eur.J.Biochem. 20, 65 (1971)
659. PALMIERI F, QUAGLIARIELLO E, KLINGENBERG M. - Eur. J.Biochem. 29,408 (1972)
660. SLUSE F.E, GOFFART G,LIEBECQ C. - Eur.J.Biochem. 29,.408 (1972)
661. LEHNINGER A.L. - Biochemistry,Worth Publ.Inc. p.352 (1972).
662. HEMMERICH P.,EHRENBERG A.,WAHLER W.A.,ERIKSSONN SALACH J.,BADER P.,SINGER T.P. - FEBS Lett. 3,37,(1969).
663. SINGER T.P.,SALACH J. - in "Methods in Enzymology Vol.18B,Acad,Press.New York p.416 (1971).
664. WALKER W.H.,SINGER T.B. - J.Biol.Chem. 245,4224, (1970).
665. GHISLA S.,HARTMANN U.,HEMMERICH P. - Angew.Chemie Int.Ed.9,642,(1970).
666. KENNEY W.C.,WALKER W.,ZESZOTEK E.,KEARNEY E.B.,SINGER T.P. - Biochim.Biophys.Res.Commun 41,488, (1970).
667, WALKER W.H.,SINGER T.P. - Em.J.Biochim. 26,279,(1972)

703. OSAWA S.,ALLFREY V.G.,MIRSKY A.E - J.Gen.Physiol. 40,491,(1957).

704. KONINGS A.W.T. - Biochim.Biophys.Acta 189,125, (1969).

705. CONOVER T.E. - Arch.Biochem.Biophys, 136,541,(1970)

706. CONOVER T.E. - Arch.Biochem.Biophys. 136,551,(1970)

707. BEREZNEY R.,FUNK L.K.,CRANE F.L. - Biochim.Biophys. Acta 223,61,(1970).

708. ZBARKY I.B. - Nature 221,257,(1969).

709. ARNOLD E.A.,YOUNG D.E. - Exptl.Cell.Ress. 52,1, (1968).

710. BEREZNEY R.,FUNK L.K.,CRANE F.L. - Biochim.Biophys Res.Comm. 38,93,(1970).

711. BEREZNEY R.,FUNK L.K.,CRANE F.L. - J.Cell.Biol. 43,12a (1969).

712. KUZMINA S.V.,ZBARSKY I.B. - FEBS Lett. 5,34,(1969).

x x x

CUPRINS

x x x